This is a digital copy of a book that was preserved for generations on library shelves before it was carefully scanned by Google as part of a project to make the world's books discoverable online.

It has survived long enough for the copyright to expire and the book to enter the public domain. A public domain book is one that was never subject to copyright or whose legal copyright term has expired. Whether a book is in the public domain may vary country to country. Public domain books are our gateways to the past, representing a wealth of history, culture and knowledge that's often difficult to discover.

Marks, notations and other marginalia present in the original volume will appear in this file - a reminder of this book's long journey from the publisher to a library and finally to you.

Usage guidelines

Google is proud to partner with libraries to digitize public domain materials and make them widely accessible. Public domain books belong to the public and we are merely their custodians. Nevertheless, this work is expensive, so in order to keep providing this resource, we have taken steps to prevent abuse by commercial parties, including placing technical restrictions on automated querying.

We also ask that you:

+ *Make non-commercial use of the files* We designed Google Book Search for use by individuals, and we request that you use these files for personal, non-commercial purposes.

+ *Refrain from automated querying* Do not send automated queries of any sort to Google's system: If you are conducting research on machine translation, optical character recognition or other areas where access to a large amount of text is helpful, please contact us. We encourage the use of public domain materials for these purposes and may be able to help.

+ *Maintain attribution* The Google "watermark" you see on each file is essential for informing people about this project and helping them find additional materials through Google Book Search. Please do not remove it.

+ *Keep it legal* Whatever your use, remember that you are responsible for ensuring that what you are doing is legal. Do not assume that just because we believe a book is in the public domain for users in the United States, that the work is also in the public domain for users in other countries. Whether a book is still in copyright varies from country to country, and we can't offer guidance on whether any specific use of any specific book is allowed. Please do not assume that a book's appearance in Google Book Search means it can be used in any manner anywhere in the world. Copyright infringement liability can be quite severe.

About Google Book Search

Google's mission is to organize the world's information and to make it universally accessible and useful. Google Book Search helps readers discover the world's books while helping authors and publishers reach new audiences. You can search through the full text of this book on the web at `http://books.google.com/`

Über dieses Buch

Dies ist ein digitales Exemplar eines Buches, das seit Generationen in den Regalen der Bibliotheken aufbewahrt wurde, bevor es von Google im Rahmen eines Projekts, mit dem die Bücher dieser Welt online verfügbar gemacht werden sollen, sorgfältig gescannt wurde.

Das Buch hat das Urheberrecht überdauert und kann nun öffentlich zugänglich gemacht werden. Ein öffentlich zugängliches Buch ist ein Buch, das niemals Urheberrechten unterlag oder bei dem die Schutzfrist des Urheberrechts abgelaufen ist. Ob ein Buch öffentlich zugänglich ist, kann von Land zu Land unterschiedlich sein. Öffentlich zugängliche Bücher sind unser Tor zur Vergangenheit und stellen ein geschichtliches, kulturelles und wissenschaftliches Vermögen dar, das häufig nur schwierig zu entdecken ist.

Gebrauchsspuren, Anmerkungen und andere Randbemerkungen, die im Originalband enthalten sind, finden sich auch in dieser Datei – eine Erinnerung an die lange Reise, die das Buch vom Verleger zu einer Bibliothek und weiter zu Ihnen hinter sich gebracht hat.

Nutzungsrichtlinien

Google ist stolz, mit Bibliotheken in partnerschaftlicher Zusammenarbeit öffentlich zugängliches Material zu digitalisieren und einer breiten Masse zugänglich zu machen. Öffentlich zugängliche Bücher gehören der Öffentlichkeit, und wir sind nur ihre Hüter. Nichtsdestotrotz ist diese Arbeit kostspielig. Um diese Ressource weiterhin zur Verfügung stellen zu können, haben wir Schritte unternommen, um den Missbrauch durch kommerzielle Parteien zu verhindern. Dazu gehören technische Einschränkungen für automatisierte Abfragen.

Wir bitten Sie um Einhaltung folgender Richtlinien:

+ *Nutzung der Dateien zu nichtkommerziellen Zwecken* Wir haben Google Buchsuche für Endanwender konzipiert und möchten, dass Sie diese Dateien nur für persönliche, nichtkommerzielle Zwecke verwenden.

+ *Keine automatisierten Abfragen* Senden Sie keine automatisierten Abfragen irgendwelcher Art an das Google-System. Wenn Sie Recherchen über maschinelle Übersetzung, optische Zeichenerkennung oder andere Bereiche durchführen, in denen der Zugang zu Text in großen Mengen nützlich ist, wenden Sie sich bitte an uns. Wir fördern die Nutzung des öffentlich zugänglichen Materials für diese Zwecke und können Ihnen unter Umständen helfen.

+ *Beibehaltung von Google-Markenelementen* Das "Wasserzeichen" von Google, das Sie in jeder Datei finden, ist wichtig zur Information über dieses Projekt und hilft den Anwendern weiteres Material über Google Buchsuche zu finden. Bitte entfernen Sie das Wasserzeichen nicht.

+ *Bewegen Sie sich innerhalb der Legalität* Unabhängig von Ihrem Verwendungszweck müssen Sie sich Ihrer Verantwortung bewusst sein, sicherzustellen, dass Ihre Nutzung legal ist. Gehen Sie nicht davon aus, dass ein Buch, das nach unserem Dafürhalten für Nutzer in den USA öffentlich zugänglich ist, auch für Nutzer in anderen Ländern öffentlich zugänglich ist. Ob ein Buch noch dem Urheberrecht unterliegt, ist von Land zu Land verschieden. Wir können keine Beratung leisten, ob eine bestimmte Nutzung eines bestimmten Buches gesetzlich zulässig ist. Gehen Sie nicht davon aus, dass das Erscheinen eines Buchs in Google Buchsuche bedeutet, dass es in jeder Form und überall auf der Welt verwendet werden kann. Eine Urheberrechtsverletzung kann schwerwiegende Folgen haben.

Über Google Buchsuche

Das Ziel von Google besteht darin, die weltweiten Informationen zu organisieren und allgemein nutzbar und zugänglich zu machen. Google Buchsuche hilft Lesern dabei, die Bücher dieser Welt zu entdecken, und unterstützt Autoren und Verleger dabei, neue Zielgruppen zu erreichen. Den gesamten Buchtext können Sie im Internet unter `http://books.google.com` durchsuchen.

QK
51
L76

UC-NRLF
$B 241 405

Dr. F. Löhnis

Landwirtschaftlich-bakteriologisches Praktikum

YB 65655

Digitized by Google

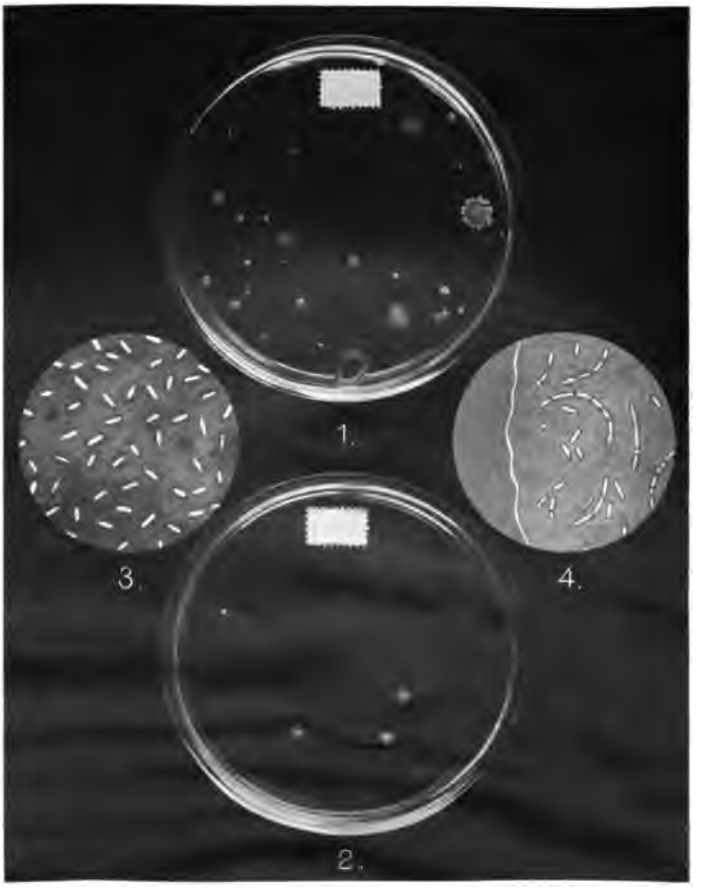
Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

2 50

Digitized by Google



1. *Keimgehalt der Stalluft* (§ 16). Die Schale wurde $^1/_2$ Minute geöffnet und am 5. Tage photographiert. $^1/_2$ nat. Gr.
2. *Keimgehalt der Laboratoriumsluft* (§ 16). Die Schale wurde 30 Minuten geöffnet und am 5. Tage photographiert. $^1/_2$ nat. Gr.
3. *Tusche-Ausstrichpräparat* (§ 24). Vergr. 900-fach.
4. *Bakterien im hängenden Tropfen* (§ 25). Vergr. 900-fach.

Digitized by Google

Landwirtschaftlich-bakteriologisches Praktikum

Anleitung zur Ausführung von landwirtschaftlich-bakteriologischen Untersuchungen und Demonstrations-Experimenten

von

Dr. F. Löhnis
Privatdozent an der Universität Leipzig

Mit 3 Tafeln und 40 Abbildungen im Text

Berlin
Verlag von Gebrüder Borntraeger
W 35 Schöneberger Ufer 12a
1911

Digitized by Google

MAIN LIBRARY

Alle Rechte,
namentlich das Recht der Übersetzung in fremde Sprachen,
vorbehalten

Copyright, 1911, by Gebrüder Borntraeger in Berlin

BIOLOGY
LIBRARY

Druck von E. Buchbinder (H. Duske), Neuruppin

Digitized by Google

QR51
L76
BIOLOGY
LIBRARY

Vorwort

Für das experimentelle Arbeiten in medizinisch-bakteriologischen Laboratorien steht eine reichhaltige Literatur zur Verfügung. Ähnlich verhält es sich in bezug auf die Mikrobiologie der Gärungsgewerbe (Brennerei, Brauerei, Weinbereitung usw.). Dagegen fehlte es bisher an einer speziellen Anleitung zur Ausführung landwirtschaftlich-bakteriologischer Untersuchungen (auf dem Gebiete der Futtermittel-, Molkerei-, Dünger- und Bodenbakteriologie). Diesem oft empfundenen Mangel soll das vorliegende Buch abhelfen. Bei der Abfassung konnte ich mich auf die Erfahrungen stützen, die ich bei der Einrichtung und bei der Leitung des bakteriologischen Laboratoriums des landwirtschaftlichen Instituts der Universität Leipzig zu sammeln Gelegenheit fand.

Die Anordnung des behandelten Stoffes geschah derart, daß sich je nach Wunsch sowohl für ein kursorisches Durcharbeiten der gesamten landwirtschaftlichen Bakteriologie wie für ein gründlicheres Eingehen auf bestimmte Fragen (auch ohne spezielle Instruktion) unschwer die erforderliche Auswahl treffen läßt.

In erster Linie ist das „Praktikum“ für Studierende der Landwirtschaft bestimmt. Doch glaube ich, daß es sich auch dann von Nutzen erweisen wird, wenn

M743825
Digitized by Google

nicht speziell bakteriologisch geschulte Berater der Landwirtschaft (Landwirtschaftslehrer, Agrikulturchemiker usw.) vor die Aufgabe gestellt werden, die in der Praxis von Tag zu Tag häufiger auftauchenden Fragen bakteriologischer Art in zutreffender Weise zu beantworten. Gerade auf diesem Gebiete sind eigene Studien oft recht angezeigt.

Die geschilderten Versuche lassen sich zu einem großen Teile mit verhältnismäßig einfachen Mitteln erledigen. Welche von ihnen zu Demonstrationszwecken besonders geeignet sind, ist aus der Zusammenstellung auf S. 143 zu ersehen. Die betreffenden Experimente können m. E. sowohl im landwirtschaftlichen Unterricht wie bei Vorträgen in landwirtschaftlichen Vereinen mit großem Nutzen Verwendung finden. Erst durch derartige Demonstrationen wird die andernfalls immer unklar bleibende Vorstellung von den Bakterien und deren Leistungen zu wünschenswerter Klarheit gebracht.

Fragen ganz spezieller Art, die hier nicht behandelt werden konnten, sind in meinem (im gleichen Verlage erschienenen) „Handbuch der landwirtschaftlichen Bakteriologie“ zu eingehender Erörterung gelangt. Ebenda finden sich die vollständigen Literaturzitate.

Einige Bemerkungen über die Einrichtungen eines bakteriologischen Laboratoriums fügte ich mit Rücksicht auf einen von verschiedenen Seiten geäußerten Wunsch im Anhange (S. 148) bei.

Den Abbildungen wurden meist (der Deutlichkeit halber) Zeichnungen zugrunde gelegt, die Herr A. Reichert nach meinen Angaben anfertigte. Die außerdem benötigten Photogramme verdanke ich Herrn O. Schröter, z. Z. II. Assistent am bakteriologischen Laboratorium.

Digitized by Google

Hoffentlich erweist sich das Buch als geeignet, Verbreitung und Vertiefung derjenigen Kenntnisse in erwünschtem Maße zu fördern, ohne die ein zutreffendes Urteil über die zahlreichen und wichtigen Fragen aus dem Gebiete der landwirtschaftlichen Bakteriologie nicht möglich ist.

Leipzig, März 1911

Dr. F. Löhnis

Digitized by Google

Inhalt

Seite

Einleitung 1

A. Einführung in die bakteriologische Technik. Luft-, Wasser- und Futtermittel-Untersuchungen

I. Apparate. Instrumente. Arbeitsregeln 5
II. Nährboden 15
III. *Luftbakterien.* Keimzählung. Kolonieformen . 24
IV. *Wasserbakterien.* Bakterien-Isolierung 30
V. Mikroskopische Prüfung 36
VI. Kulturelle Prüfung 46
VII. *Heubakterien.* Bakterien-Sporen 52
VIII. Beschreibung und Bestimmung der Bakterien . . 57
IX. *Kartoffelbakterien.* Anaëroben-Technik 62
X. Spezielle Methoden 67

B. Molkerei-Bakteriologie

XI. *Keimgehalt der Milch.* Schleuderproben . . . 70
XII. Reduktase-, Katalase-, Koch- und Alkoholprobe 75
XIII. Milch- und Lab-Gärproben. Nachweis von Fremdinfektionen 78
XIV. Bacterium coli und Bacterium aërogenes (Aërobacter-Gruppe) 81
XV. Milchsäure-Bakterien 82
XVI. Labproduzierende Bakterien. Kaseïnlösung . . 85
XVII. Aromaproduktion. Schleimbildung 87
XVIII. Fermentierte Milch 89
XIX. Erhitzte Milch. Anaërobe Milchbakterien . . . 92

Digitized by Google

Seite

XX. *Keimgehalt der Butter* 94
XXI. Fettzersetzung 96
XXII. *Keimgehalt des Käses* 97
XXIII. Käse-Milchsäurebakterien. Anaërobe Käsebakterien 99
XXIV. Verflüssigende Bakterien. Sproß- und Schimmelpilze 101

C. Dünger-Bakteriologie

XXV. *Keimgehalt des Stalldüngers* 104
XXVI. Anaërobe Pektin- und Zellulose-Zersetzung . . 107
XXVII. Bildung von Gasen. Thermophile Bakterien . . 109
XXVIII. Harnstoff-, Hippursäure- und Harnsäure-Bakterien 111
XXIX. Nitrifikation. Denitrifikation. Nitratreduktion . 113
XXX. Amid-, Ammon- und Salpeter-Assimilation . . 116

D. Boden-Bakteriologie

XXXI. *Keimgehalt des Bodens* 118
XXXII. Kohlensäure-Produktion. Gärungs-Intensität . . 121
XXXIII. Aërobe Pektin- und Zellulose-Zersetzung . . . 122
XXXIV. Verarbeitung von Methan, Wasserstoff und Kohlenoxyd 123
XXXV. Ammoniakbildung aus organ. Stickstoff-Düngern 124
XXXVI. Ammoniakbildung aus Harnstoff und aus Cyanamid 126
XXXVII. Nitrifikation. Denitrifikation. Nitratreduktion . 128
XXXVIII. Knöllchenbakterien 130
XXXIX. Freilebende Stickstoff-Assimilanten 132
XL. Umsetzung mineralischer Substanzen 135

Anhang

I. Schlüssel zur Bakterien-Bestimmung 137
II. Demonstrations-Experimente 143
III. Herstellung von Dauer-Präparaten 146
IV. Laboratoriums-Einrichtung 148
V. Bezugsquellen 150

Sachregister 151

Digitized by Google

Digitized by Google

Einleitung

Zweck und Aufgaben landwirtschaftlich-bakteriologischer Untersuchungen. Allgemein gesprochen, handelt es sich darum, über Vorkommen und Tätigkeit der Mikroorganismen im Futter, in Milch oder Molkereiprodukten, im Stalldünger oder im Boden die jeweils gewünschte Auskunft zu erlangen. Gilt es, irgend eine bestimmte Umsetzung oder Zersetzung eingehend zu erforschen, so ist nacheinander festzustellen:

1. *ob durch Übertragung geringer Mengen von der in Zersetzung begriffenen Substanz auf zersetzungsfähiges Material ähnlicher Beschaffenheit die betreffende Erscheinung experimentell hervorgerufen werden kann;*
2. *ob und welche Mikroorganismen vorhanden, bezw. an dem Prozeß beteiligt sind;*
3. *ob und eventuell auf welchem Wege es möglich wird, die in Frage kommende Um- oder Zersetzung, je nachdem es wünschenswert erscheint, zu fördern oder zu verhindern.*

In praxi ist es allerdings häufig ausreichend oder geradezu notwendig, sich ausschließlich auf den einen oder den andern Punkt zu beschränken. Beim Auftreten eines Milchfehlers wird z. B. in der Regel nur die Frage nach einer geeigneten Bekämpfungsmethode zu beantworten sein. Das Auffinden der richtigen Antwort ist indessen naturgemäß nur dann sichergestellt, wenn die vorher genannten Auf-

Digitized by Google

gaben bereits anderweit sachgemäße Erledigung gefunden haben.

Literatur. Wegen etwa gewünschter, spezieller Auskünfte ist zunächst auf folgende Werke zu verweisen:

1. Mikroskopische Technik.
   Ehrlich-Weigert, Enzyklopädie der mikroskopischen Technik,
   Hager-Mez, Das Mikroskop und seine Anwendung,
   Strasburger, Das botanische Praktikum.
2. Bakteriologische Technik im allgemeinen.
   Günther, Einführung in das Studium der Bakteriologie,
   Heim, Lehrbuch der Bakteriologie,
   Hueppe, Die Methoden der Bakterienforschung,
   Küster, Anleitung zur Kultur der Mikroorganismen,
   Meyer, Praktikum der botanischen Bakterienkunde.
3. Bakteriologische Diagnostik.
   Lehmann u. Neumann, Atlas und Grundriß der Bakteriologie,
   Matzuschita, Bakteriologische Diagnostik,
   Migula, System der Bakterien, Bd. II.
4. Spezielle, agrikulturbakteriologische Technik und Diagnostik.
   Lafar, Handbuch der technischen Mykologie, Bd. II u. III,
   Löhnis, Handbuch der landwirtschaftlichen Bakteriologie.
5. Biologische und agrikulturchemische Untersuchungsmethoden.
   Abderhalden, Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden,
   Glikin, Biochemisches Taschenbuch,
   König, Untersuchung landwirtschaftlich und gewerblich wichtiger Stoffe.
6. Milchbakteriologie und Milchuntersuchung.
   Kirchner, Handbuch der Milchwirtschaft,
   Sommerfeld, Handbuch der Milchkunde,
   Teichert, Methoden zur Untersuchung von Milch und Molkereiprodukten.

Digitized by Google

7. Literatur über Mikrobiologie der Gärungsgewerbe, Hefen und Schimmelpilze.

Henneberg, Gärungsbakteriologisches Praktikum, Betriebsuntersuchungen und Pilzkunde,
Jörgensen, Die Mikroorganismen der Gärungsindustrie,
Lafar, Handbuch der technischen Mykologie, Bd. IV u. V,
Lindner, Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben,
Zopf, Die Pilze.

8. Mikrophotographie.

Fuhrmann, Leitfaden der Mikrophotographie,
Neuhauß, Anleitung zur Mikrophotographie,
Neuhauß, Lehrbuch der Mikrophotographie.

9. Periodische Literatur, referierende Organe.

Die Zersplitterung der einschlägigen Literatur ist sehr groß. In mehr als 300 Bulletins, Journalen, Reports und Zeitschriften finden sich dann und wann Artikel, die für den wissenschaftlich arbeitenden Agrikultur-Bakteriologen von Interesse sind. Die Ergebnisse der bis Mitte 1909 publizierten Arbeiten sind in meinem „Handbuch der landwirtschaftlichen Bakteriologie" zusammengefaßt.

Als wichtigstes Organ für Agrikulturbakteriologie ist zu nennen: *Centralblatt für Bakteriologie, II. Abteilung* (Originalarbeiten und Referate aus dem Gebiete der allgemeinen und der landwirtschaftlichen Bakteriologie).

Sehr vollständige Zusammenstellungen der einschlägigen Arbeiten finden sich in folgenden referierenden Organen:

Centralblatt für Agricultur-Chemie, begründet von R. Biedermann (teils ausführliche, teils kurze Referate aus der agrikulturchemischen, landwirtschaftlichen und bakteriologischen Literatur),

Experiment Station Record (annähernd vollständige Übersicht der landwirtschaftlichen Weltliteratur in kurzen Referaten),

Digitized by Google

Jahresbericht über die Fortschritte auf dem Gebiete der Agriculturchemie, begründet von R. Hoffmann (systematisch geordnete Referate über agrikulturchemische, bakteriologische und landwirtschaftliche Publikationen),

Jahresbericht über die Fortschritte in der Lehre von den Gärungsorganismen, begründet von A. Koch (systematisch geordnete Referate über allgemeine, landwirtschaftliche Bakteriologie und Mikrobiologie der Gärungsgewerbe).

Weiterhin kommen in Betracht:

Biochemisches Zentralblatt (u. a. Referate über Biochemie der Mikroorganismen),

Bulletin de l'Institut Pasteur (Referate aus dem Gesamtgebiete der Bakteriologie),

Centralblatt für Bakteriologie, I. Abteilung (Originalarbeiten und Referate vorwiegend medizinisch-bakteriologischer Art),

Chemisches Centralblatt (bringt u. a. kurze Referate aus der agrikulturchemischen und bakteriologischen Literatur in der Regel sehr bald nach der Veröffentlichung),

Journal of the Chemical Society (neben Originalarbeiten und Referaten rein chemischen Inhalts, auch Referate agrikultur-chemischer und mikrobiochemischer Arbeiten).

Digitized by Google

A. Einführung in die bakteriologische Technik. Luft-, Wasser- und Futtermittel-Untersuchungen

I. Apparate. Instrumente. Arbeitsregeln

1. Apparate. Die wichtigsten Apparate des bakteriologischen Laboratoriums sind

A. Einrichtungen zur *Sterilisierung* von Geräten, Gefäßen und Nährböden:
   1. Heißluft-Sterilisator oder Trockenschrank,
   2. Dampfsterilisator nach R. Koch, sog. Dampftopf,
   3. Autoklav (zum Sterilisieren in gespanntem Dampf);

B. Einrichtungen zur *Züchtung* der Mikroorganismen bei bestimmten Temperaturen: Brutschränke oder Thermostaten.

Der Trockenschrank (Abb. 1) ist ein doppelwandiger, zweckmäßig mit Asbest umkleideter Kasten aus Eisenblech mit Kupferboden, dessen Innenraum durch Gas- oder Spiritusheizung auf 160—170° C, eventuell auch auf 200° C erhitzt werden kann.

Er dient hauptsächlich zum Sterilisieren von Glasgerätschaften, worüber das Nähere später mitgeteilt wird.

Der Dampftopf (Abb. 2) besteht aus einem mit Filz, Asbest oder dergl. umkleideten Zink- oder Weißblechzylinder, an dessen unterem Ende, unterhalb eines Rostes, ein kupferner Wasserkessel befestigt ist. Der stumpf-kegel-

Digitized by Google

förmige, mit Handgriffen versehene Deckel liegt lose in einer Rinne auf. Zur Vergrößerung des verfügbaren Raumes dient nötigenfalls ein zweiter, gleichgroßer, zum Aufsetzen auf den unteren bestimmter Zylinder. Eine Vorrichtung zur Erhaltung eines konstanten Wasserniveaus im Kessel ist nicht absolut nötig, aber sehr nützlich, um ein Leer- und eventuell Durchbrennen des Kessels zu verhindern.

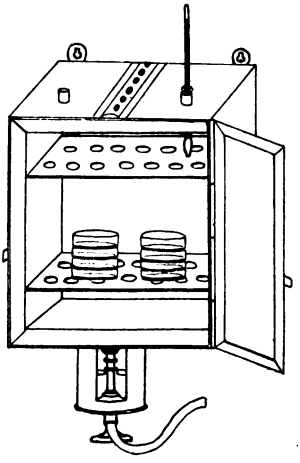


Abb. 1. Trockenschrank (ca. $^1/_{15}$ nat. Größe).

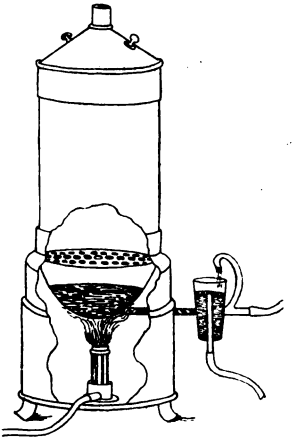


Abb. 2. Dampftopf mit konstantem Wasserzufluß (ca. $^1/_{15}$ nat. Größe).

Der Dampftopf wird am häufigsten für Zubereitung und Sterilisierung von Nährböden in weiterhin noch zu besprechender Weise verwendet.

Der Autoklav (Abb. 3) besteht aus einem zylindrischen, im unteren Teile mit Wasser gefüllten Behälter, dessen mit Bleidichtung versehener Deckel durch einen zweckentsprechend konstruierten Bügel fest aufgepreßt werden kann. Im Deckel ist das Manometer und das Sicherheits-

Digitized by Google

ventil angebracht. An dem letzteren befindet sich seitlich eine kleine durch Hahn- oder Schraubenventil verschließbare Öffnung. Außerdem pflegt im Deckel eine (unten geschlossene) Hülse zum Einstecken des Thermometers angebracht zu sein.

Spezielle Angaben über die Benutzung des Autoklaven folgen in §§ 8 und 11. Für gewisse Fälle ist es, speziell zur Beschleunigung der Arbeit, sehr wünschenswert, wenn ein Autoklav zur Verfügung steht. Doch kann man auch ohne diesen ziemlich teuren Apparat recht gut auskommen.

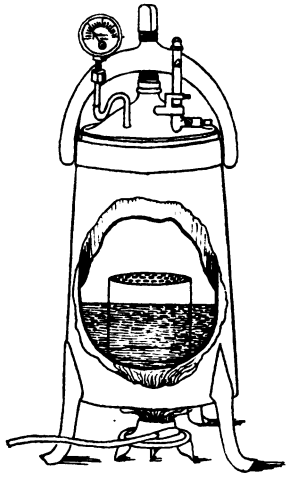


Abb. 3. Autoklav (ca. $^1/_{10}$ nat. Größe).

Bei den Brutschränken oder Thermostaten (Abb. 4 und 5) wird der Zweck, im Innenraume eine bestimmte Temperatur möglichst konstant zu erhalten, auf sehr verschiedenen Wegen erreicht. In der Regel werden größere Wasser- oder Glyzerinmengen, die in besonders konstruirten Behältern den zur Aufnahme der Kulturen bestimmten Raum umgeben, durch Brenner erwärmt, deren Heizkraft durch Thermoregulatoren automatisch verstärkt oder vermindert werden kann. Ein Ausströmen des Gases nach etwaigem Verlöschen der Flamme wird durch die sog. „Sicherheitsbrenner“ dadurch verhindert, daß sich diese beim Erkalten durch einen herabfallenden Hebel selbsttätig schließen.

Die genannten Apparate können eventuell (abgesehen vom Autoklaven) durch geschickte Handwerker für verhältnismäßig wenig Geld improvisiert werden. Im Notfalle genügt auch ein

Digitized by Google

Topf mit warmem bezw. kochendem Wasser. Stehen reichliche Mittel zur Verfügung, so kann man zum Ankauf komplizierterer Apparate schreiten, wie sie in den illustrierten Katalogen der betreffenden Firmen (s. Anhang V) angegeben sind. Doch läßt sich im allgemeinen gerade auf bakteriologischem Gebiet bei rationeller Versuchsanstellung mit verhältnismäßig einfachen Mittel relativ viel erreichen.

Neben den sonstigen einfachen Vorrichtungen zum Herstellen der Nährböden (emaillierte Töpfe, Gefäße zum Ab-

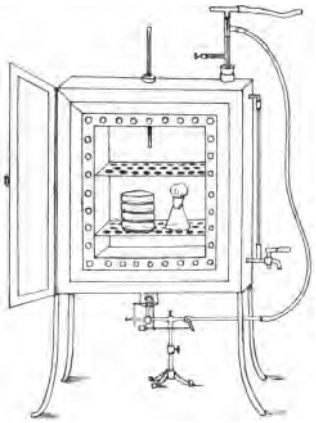


Abb. 4.
Brutschrank mit Sicherheitsbrenner
(ca. $^1/_{10}$ nat. Größe).

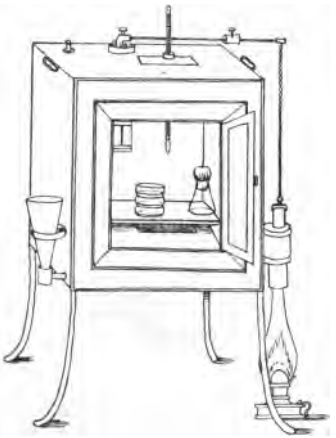


Abb. 5.
Brutschrank von Sartorius
(ca. $^1/_{10}$ nat. Größe).

messen von Flüssigkeiten, Dreifüße, Brenner, Drahtkörbe usw.) bedürfen noch zwei besonders konstruierte Filtrierapparate kurzer Erwähnung: Der Heißwassertrichter und die (allerdings nur selten gebrauchte) Filtriervorrichtung zur Gewinnung keimfreier Flüssigkeiten.

Der Heißwassertrichter (Abb. 6) besteht aus einem Glastrichter, der von einem mit seitlichem Ansatz versehenen

Digitized by Google

Kupfermantel umgeben ist. Der Zwischenraum wird vor dem Gebrauche mit Wasser gefüllt, das durch einen unter den seitlichen Ansatz gestellten Brenner erhitzt und dauernd warm gehalten wird.

Der wichtigste Teil der Filtriervorrichtung zur Gewinnung keimfreier Flüssigkeiten ist ein einseitig geschlossener Zylinder aus Porzellan oder Kieselgur, die sog. Filterkerze, durch deren sehr enge Poren die zu steri-

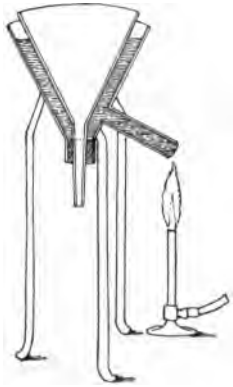


Abb. 6. Heißwassertrichter ($^1/_{10}$ nat. Größe).

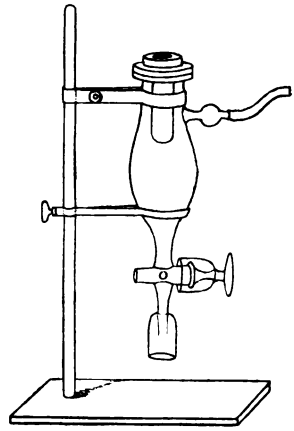


Abb. 7. Apparat nach Maaßen ($^1/_{10}$ nat. Größe).

lisierende Flüssigkeit (unter Benutzung einer Wasserstrahlpumpe oder dergl.) hindurchgepreßt wird. Das Filtrat gelangt dann in ein vorher keimfrei gemachtes Auffanggefäß.

Im einzelnen sind diese Vorrichtungen sehr verschiedenartig konstruiert. Einen verhältnismäßig einfachen Apparat (nach Maaßen) zeigt Abb. 7. Wie gesagt, beschränkt sich die Anwendung auf Ausnahmefälle, in denen die betreffende Nährlösung beim Sterilisieren im Dampfe unerwünschte Veränderungen erleiden würde, vergl. § 120.

Digitized by Google

2. Instrumente. Abgesehen von einigen, nur für spezielle Zwecke benötigten Gerätschaften, die am entsprechenden Orte angegeben werden, sind für die nachstehend besprochenen Untersuchungen erforderlich:

1 Mikroskop für Vergrößerungen von etwa 50- bis 1000-fach (2 Okulare, davon eines mit Mikrometer, 3 Objektive, Objektivrevolver, großer beweglicher Objektivtisch mit Beleuchtungsapparat nach Abbe) kann nötigenfalls von zwei Praktikanten gemeinschaftlich benutzt werden.

1 Platinnadel und 1 Platinöse zum Überimpfen der Bakterien, 6—8 cm lange, 0,5 mm starke Platindrähte in 6 mm dicke, 20 cm lange Glasstäbe eingeschmolzen. Auch besondere, teurere Nadelhalter werden geliefert. Der durch Umbiegen des Drahtes gebildeten Öse gibt man einen Durchmesser von ca. 2 mm.

1 Bunsenbrenner mit Sparflamme.

1 feine, weichfedernde Pinzette zum Deckgläserspülen usw.

1 stärkere Pinzette zum Ausziehen der Watte aus Anaërobengläsern und dergl.

1 Cornetpinzette, die sich auf Druck öffnet, zum Halten von Deckgläsern beim Färben.

30 Petrischalen für Gußkulturen. Doppelschalen von 10 cm Durchmesser und 14 mm Höhe, mit ebenem Boden.

2 Teller mit Glasglocken zum Aufbewahren der beschickten Petrischalen.

2 größere Doppelschalen (12—15 cm Durchmesser, 3—4 cm Höhe). In die eine kommt ein Gemisch von gleichen Teilen Alkohol und Xylol + ca. 3% Salzsäure, zum Reinigen gebrauchter Objektträger und Deckgläser. Die andere ist zur Aufnahme reiner Objektträger bestimmt.

1 Spülschale (16 cm × 7 cm) zum Auffangen des Spülwassers beim Anfertigen gefärbter Präparate.

1 Spritzflasche.

1 Fläschchen mit Zedernholzöl, mit weitem Hals, Glasstab und Glaskappe.

1 ebensolches Fläschchen mit Canadabalsam.

Digitized by Google

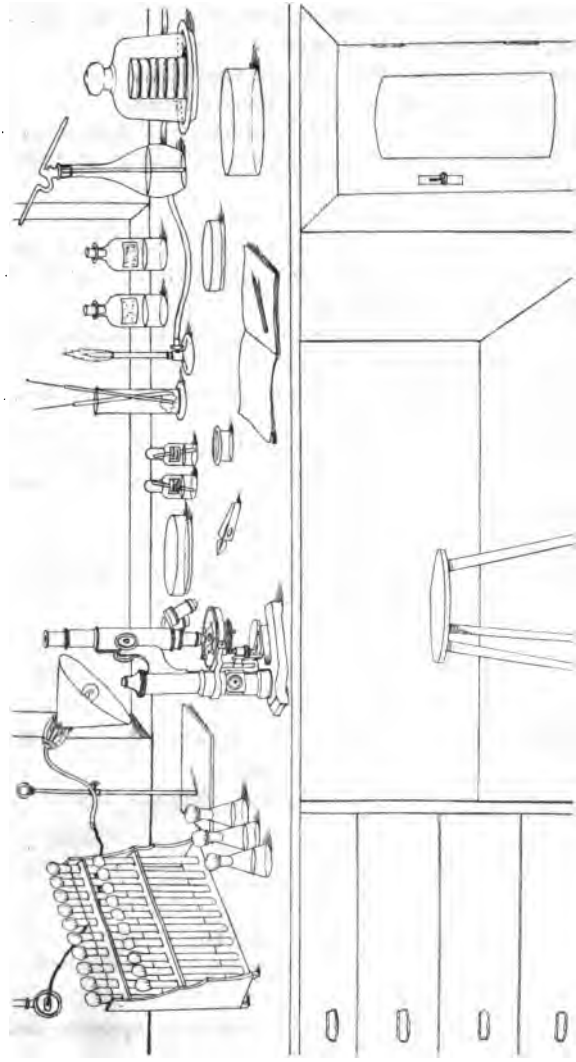


Abb. 8. Arbeitsplatz mit Gerätschaften (ca. $^1/_{15}$ nat. Größe).

Digitized by Google

4 gewöhnliche ca. 100 ccm-Flaschen mit Korkstopfen für Farblösungen, Xylol und Essigsäure.

5 Erlenmeyer-Kolben mit 300 ccm Inhalt.

25 Erlenmeyer-Kolben mit 50 ccm Inhalt.

2 Rundkolben, davon 1 mit 1000 ccm, 1 mit 2000 ccm Inhalt.

1 Satz Bechergläser (Jenaer Glas mit Ausguß) zu 1000, 800, 600, 500, 400, 300 und 200 ccm Inhalt.

2 Trichter, 1 großer und 1 kleinerer.

200 Reagenzgläser, 160 × 16 mm, für Nährböden usw.

12 dickere Reagenzgläser (gleicher Größe) mit Gummistopfen für Anaërobenkulturen.

12 große Reagenzgläser für Gär-, Reduktionsproben, zum Aufbewahren von Pipetten usw.

3 große Reagenzgläser mit Glastrog und Gummistopfen für Anaërobenkulturen.

2 Gestelle für je 24 Reagenzgläser.

3 Kästen oder Glashäfen zum Aufbewahren von Reagenzgläsern mit fertiggestellten Nährböden.

2 Glasstäbe.

3 Röhren nach Burri (160 × 16 mm) mit je 1 Gummistopfen zur Anaëroben-Isolierung.

1 9-ccm-Pipette.

10 1-ccm-Pipetten.

1 Schere.

1 Hornlöffel.

Glatte und hohlgeschliffene Objektträger, 76 × 26 mm, 1,2 mm dick, mit geschliffenen Kanten.

Deckgläschen, 18 × 18 mm, 0,15—0,18 mm dick.

Etiketten, ca. 2 × 3 cm.

Filtrierpapier.

Fettfreie und fetthaltige Watte.

Wischtücher.

Fettfarbstift, zum Schreiben auf Glas.

Feder und Tinte.

Schreibheft (Arbeitsjournal).

Literatur: Ausführlichere Angaben über Apparate und Ge-

Digitized by Google

rätschaften finden sich in den betreffenden Kapiteln der auf S. 2 angegebenen Werke über bakteriologische Technik. Vergl. ferner: Pfeffer, Berichte d. deutschen botan. Gesellschaft 13, 1895, S. 49 (Brutzimmer), Kuntze, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., 17, S. 684 (großer, relativ billiger Thermostat für 20° C), sowie die illustrierten Kataloge der im Anhang V genannten Firmen (für Laboratoriumsbedarf).

3. Arbeitsregeln. Übung in den einfacheren botanischen und chemischen (quantitativen) Methoden ist für den bakteriologischen Praktikanten in jedem Falle von großem Vorteil, direkt unentbehrlich aber dann, wenn eine eingehendere Beschäftigung mit derartigen Fragen beabsichtigt ist.

Um Zeitverlust zu vermeiden, ist es stets angezeigt, nicht nur das gerade zu bearbeitende Kapitel durchzulesen, sondern sich auch schon vorgreifend über die in den nächsten Kapiteln enthaltenen Angaben über Vorbereitung, Anordnung und Dauer der betreffenden Versuche zu informieren und die nötigen Vorarbeiten rechtzeitig zu erledigen.

Besondere Beachtung erfordern die nachstehenden Laboratoriums-Regeln, deren Begründung an späteren Stellen gegeben werden wird, soweit eine solche notwendig erscheint.

1. Überall im Laboratorium, vor allem auf den Mikroskopiertischen hat die größte Ordnung und Sauberkeit zu herrschen.

2. Abfälle (Papier, Watte, Streichhölzer usw.) sind nicht auf den Fußboden oder in die Becken der Wasserleitung zu werfen, sondern in die dafür aufgestellten Abfallkästen zu bringen. Leicht von Schimmelpilzen angreifbare oder rasch in Fäulnis übergehende Abfälle sind sofort aus dem Laboratorium zu entfernen.

3. An Schimmelpilzsporen reiche Kulturgläser usw. dürfen nicht im Laboratorium geöffnet werden. Desgleichen ist Staubentwickelung

Digitized by Google

und jede sonstige Verunreinigung der Luft nach Möglichkeit zu vermeiden.

4. Alle für den allgemeinen Gebrauch bestimmten Gegenstände (Chemikalien, Meßzylinder, Drahtkörbe usw.) sind sofort nach jedesmaliger Benutzung, wenn nötig gründlich gereinigt, an ihren bestimmten Platz zurückzubringen. Zur Säuberung des Heißwassertrichters ist — damit der Glastrichter nicht zerspringt — warmes Wasser zu verwenden.

5. Die Mikroskope sind mit größter Sorgfalt zu behandeln. Sobald sie nicht mehr gebraucht werden, sind sie in die Schränke zurückzubringen. Bei Benutzung des Immersionssystems ist nach jedesmaliger Beendigung der mikroskopischen Arbeiten das Objektiv mit einem mit einer Spur Xylol befeuchteten feinen Tuche vorsichtig von dem anhaftenden Zedernholz-Öl zu befreien. Viel Xylol löst den Linsenkitt!

6. Beim Gebrauch der Dampf-Sterilisatoren ist stets darauf zu achten, daß sie genügend Wasser enthalten, bezw. daß Wasser-Zu- und -Abfluß in Ordnung sind. Die Bleidichtung des Autoklaven erfordert besonders schonende Behandlung.

7. Die im Trockenschrank zu sterilisierenden Gegenstände dürfen nicht feucht eingestellt werden. Erst nach erfolgtem Erkalten ist der Apparat wieder zu öffnen.

8. Unnötiges Öffnen und Offenlassen der Brutschränke ist zu vermeiden.

9. Säurehaltige Waschwässer und dergl. dürfen nur in die speziell dafür bestimmten Ausgußbecken gebracht werden.

10. Jede Verschwendung von Gas und Wasser ist zu vermeiden. Beim Verlassen des Laboratoriums sind sämtliche Gasflammen auszudrehen, sofern sie nicht, wie am Thermostaten, dauernd brennen müssen.

Digitized by Google

II. Nährböden

4. Standard-Nährböden. Folgende sechs Nährsubstrate sind stets vorrätig zu halten und zu allen vergleichenden Untersuchungen zu verwenden: *Fleischgelatine*, *Fleischagar*, *Traubenzucker-Agar*, *Bouillon*, *Milch*, *Kartoffeln*. Allerdings machen sich bei agrikultur-bakteriologischen Untersuchungen nicht selten Spezial-Nährböden erforderlich. Für viele Fälle sind jedoch die Standard-Nährböden recht gut geeignet. Keine Bakterienart kann als ausreichend beschrieben gelten, die nicht in ihrem Verhalten zu den genannten sechs Substraten eingehend geprüft ist.

Einzelheiten über Zweck und Verwendung der verschiedenen Nährböden ergeben sich aus den folgenden Kapiteln. Hier sei zunächst nur hervorgehoben, daß Gelatine (Knochenleim) stickstoffhaltig, Agar (ein kohlehydratreiches Produkt aus Meeresalgen) fast stickstofffrei ist; Fleischgelatine schmilzt und erstarrt bei ca. 25° C, Fleischagar schmilzt bei nahezu 100°, erstarrt aber erst bei 40° C. Diese ungleichen Eigenschaften entscheiden in vielen Fällen über die Brauchbarkeit des einen oder des andern Substrats.

5. Vorbereitung der Gläser. Die zur Aufnahme der Nährböden bestimmten Reagenzgläser (150 Stück) sind in einen großen, mit Wasser gefüllten Topf derart einzulegen, daß möglichst wenig Luftblasen in ihnen verbleiben. Sind die Gläser neu, so ist soviel Salzsäure hinzuzufügen, daß die Reaktion deutlich (nicht stark!) sauer wird; bei schon gebrauchten Gläsern unterbleibt dieser Zusatz. Der Topf wird auf einen Dreifuß gestellt und das Wasser durch einen oder mehrere untergestellte Brenner bis zum beginnenden Sieden erhitzt. Dann dreht man die Flammen aus und läßt erkalten. Schließlich werden die Gläser unter der Wasserleitung gründlich gespült und an geeigneter Stelle zum Abtrocknen hingelegt.

Digitized by Google

Säurehaltige Waschwässer dürfen nur in die speziell dafür bestimmten Ausgußbecken gebracht werden.

Der für neue Gläser vorgeschriebene Säurezusatz soll das heiße Wasser bei der Lösung des Alkalis, das noch nicht benutzte Gläser meist abgeben, unterstützen. Würde dieses nicht gründlich entfernt, so erführen die eingefüllten Nährböden beim Sterilisieren eine für ihre Brauchbarkeit nachteilige Änderung der Reaktion.

6. Bouillon. Während des Auskochens der Gläser werden 1000 ccm Bouillon nach einem der folgenden Rezepte hergestellt:

a) 500 g geschabtes, fettfreies, ungesalzenes Rindfleisch wird in einem Topfe mit 1 Liter Leitungswasser übergossen. Nach gründlichem Verrühren bleibt das Gemisch 12—24 Stunden bei niedriger Temperatur stehen. Dann bringt man auf einen 1000 ccm-Meßzylinder einen großen Trichter, überdeckt diesen mit einem Tuche und läßt den Fleischsaft hindurchfiltrieren. Zuletzt faßt man die Zipfel des Tuches zusammen und preßt das Fleisch gründlich aus, bis nahezu 1000 ccm Saft gewonnen sind. Nach erneutem Auffüllen auf 1000 ccm gibt man die Flüssigkeit in ein großes Becherglas. Dann wird 1 % Pepton siccum Witte sowie ½ % Kochsalz hinzugefügt und das mit einer Glasschale bedeckte Gefäß 1 Stunde im Dampftopf erhitzt.

Das ausgepreßte Fleisch ist sogleich aus dem Laboratorium zu entfernen.

b) 1000 ccm Leitungswasser + 10 g Liebigs Fleischextrakt + 10 g Pepton siccum Witte + 5 g Kochsalz werden im bedeckten Becherglas 1 Stunde im Dampftopf erhitzt.

c) 22 g Ragit-Bouillon (von E. Merck in Darmstadt) werden mit 1000 ccm Leitungswasser in einem mit Wattebausch verschlossenen Literkolben 1 Stunde im Dampftopf erhitzt.

Rezept a gibt die teuerste Bouillon; für genaue, vergleichende Untersuchungen muß aber danach verfahren werden. Rezept b und c sind wesentlich billiger, c empfiehlt sich durch größte Einfachheit.

Digitized by Google

Bei der Benutzung des Dampftopfes ist stets darauf zu achten, daß genügend Wasser darin vorhanden ist, bezw. daß Wasser-Zu- und -Abfluß in Ordnung sind.

Nach dem Erhitzen wird die Bouillon mit Hilfe eines großen Papier-Faltenfilters von den entstandenen Niederschlägen und Trübungen befreit. Sodann wird die Reaktion geprüft und nötigenfalls durch vorsichtigen, tropfenweisen Zusatz konzentrierter Sodalösung derart eingestellt, daß mit Wasser angefeuchtetes rotes Lackmus-Papier von der heißen Bouillon schwach aber deutlich blau gefärbt wird.

Ist die Flüssigkeit zu stark alkalisch geworden, so muß die Reaktion durch Phosphorsäure-Zusatz richtig gestellt werden.

Man kann auch zunächst an 10 ccm Bouillon, die man in einer Porzellanschale 3 Minuten kocht und nach Zusatz von Phenolphthaleïn (1 ccm 5-proz. Lösung in 50-proz. Alkohol) heiß titriert, feststellen, wieviel Kubikzentimeter $^1/_{10}$ Normal-Natronlauge erforderlich sind, um schwache, aber deutliche Rotfärbung hervorzurufen. Danach wird auf 1000 ccm soviel Normallauge zugegeben, daß 5 bis 10 ccm am Erreichen des Neutralpunktes fehlen.

Von der warmen Bouillon werden (vorsichtig!) 700 ccm abgemessen, die zur Bereitung von Fleischgelatine und Fleischagar bestimmt sind. Der Rest wird nochmals $^1/_2$—$^3/_4$ Stunde im Dampftopf im bedeckten Becherglas erhitzt. Etwa neu entstandene Trübungen werden wie vorher entfernt.

Beim Abmessen heißer Flüssigkeiten sind die Meßzylinder durch Eingießen kleiner Mengen langsam anzuwärmen; andernfalls zerspringen sie oft.

7. Fleischgelatine. 350 ccm der filtrierten, warmen Bouillon (§ 6) werden in einem Becherglas mit 10% feinster Speisegelatine (von Grübler & Co. in Leipzig) versetzt. Nachdem sich diese aufgelöst hat, wird die (wieder sauer gewordene) Reaktion von neuem richtiggestellt und die

Digitized by Google

Mischung im bedeckten Gefäß $^3/_4$ Stunde im Dampftopf erhitzt. Danach wird die Reaktion abermals geprüft und nötigenfalls korrigiert. Wenn die Temperatur auf etwa 50° C gesunken ist, wird das (auf einem Teller mit dem Glasstab gut verrührte) Weiße eines frischen Hühnereies gründlich mit der Gelatine vermischt und diese zum letzten Male $^1/_2$—$^3/_4$ Stunde in den Dampftopf gestellt. Schließlich wird sie unter Benutzung des zuvor angewärmten Heißwassertrichters (Abb. 6) durch ein festes (nötigenfalls doppeltes) Papier-Faltenfilter in ein Becherglas filtriert.

Der Heißwassertrichter ist sofort nach Gebrauch und zwar — damit der Glastrichter nicht zerspringt — mit warmem Wasser zu reinigen.

Richtig zubereitete Fleischgelatine muß völlig klar sein und bei Zimmertemperatur fest erstarren. Wird genau nach der angegebenen Vorschrift verfahren, so ergeben sich keine Schwierigkeiten. Ohne Eiweiß-Zusatz ist es meist sehr schwer, eine völlig klare Gelatine zu erhalten. Nahezu unmöglich wird dies, wenn die Reaktion zu stark alkalisch gemacht wurde, wenn das Ei nicht mehr frisch war, oder wenn Teile vom Eidotter mit in die Gelatine gelangten.

8. **Fleischagar.** 350 ccm Bouillon (§ 6) werden im Becherglas mit $1^1/_2$% Agar (in □-Stangen) vermischt. Das Agar ist vorher in kleine Stücke zu zerpflücken, damit es sich leichter löst. Man läßt 1—2 Stunden, eventuell auch über Nacht in einem kühlen Raume quellen. Dann wird im Autoklav bis auf $1^1/_2$ Atmosphären Überdruck (oder 1 Stunde im Dampftopf) erhitzt und im Heißwassertrichter durch einen ca. 3 cm im Durchmesser haltenden, ziemlich festen Wattebausch filtriert.

Regeln für den Gebrauch des Autoklaven. Man überzeuge sich zunächst, daß genügend Wasser im Apparat vorhanden ist. Nach Einstellen des zu erhitzenden Gegenstandes wird

Digitized by Google

der Deckel vorsichtig aufgesetzt, *ohne die Bleidichtung zu verletzen.* Durch seitliches Drehen wird er in die (an Markierungen kenntliche) richtige Lage gebracht. Nun wird der Bügel aufgeschraubt, die Austrittsstelle für den Dampf voll geöffnet und das Gas angezündet. Sobald ein kräftiger Dampfstrahl aus dem Apparat entweicht, schließt man das Ventil und läßt das Manometer bis auf $1^1/_2$—2 Atmosphären Überdruck ansteigen. Dann dreht man die Flamme ab, läßt das Manometer bis auf 0 zurückgehen und öffnet das seitliche Ventil, damit allmählicher Druckausgleich mit der Außenluft eintreten kann. Einige Minuten später wird der Bügel abgeschraubt und der Deckel (vorsichtig!) abgehoben.

Häufig vorkommende Fehler bei der Benutzung des Autoklaven sind:

1. Zu frühes Schließen der Dampf-Austrittsstelle. Mit Dampf gemischte Luft wirkt weit weniger intensiv als gesättigter Dampf.

2. Zu frühes Öffnen der Dampf-Austrittsstelle nach beendeter Erhitzung. Plötzliche Druckverminderung bedingt heftiges Aufwallen und Verspritzen der eingestellten Flüssigkeit.

Durch ein eingestecktes Thermometer kann der Apparat, und speziell das Manometer, einer von Zeit zu Zeit nötigen Kontrolle unterworfen werden. Beim kräftigen Ausströmen des Dampfes muß das Thermometer 95—98° C anzeigen, beim Stand des Manometers auf 1 Atm. ca. 120°, bei 2 Atm. 130° C.

Beim Eingießen des Agars in den Heißwassertrichter hält man zweckmäßig den Wattebausch durch einen Glasstab fest, an dem man das Agar herablaufen läßt. Über die Behandlung des Heißwassertrichters nach beendigtem Filtrieren vergl. § 7.

Da Agar (im Gegensatz zu Gelatine) auf die Reaktion ohne Einfluß bleibt, so macht sich, falls diese vorher richtig eingestellt war, weiterhin keine Änderung mehr nötig. Agar bleibt stets mehr oder minder trüb.

Digitized by Google

Fleischagar kann auch direkt durch Aufkochen von Ragitagar von E. Merck in Darmstadt (42 g + 1000 ccm Wasser) hergestellt werden.

9. Traubenzucker-Agar. 125 ccm des filtrierten Fleisch-Agars (§ 8) werden mit $^1/_2\,\%$ Traubenzucker versetzt, der vorher in einigen Kubikzentimetern warmen Wassers aufgelöst wurde.

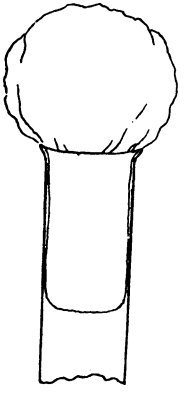


Abb. 9. Richtig hergestellter Wattestopfen.

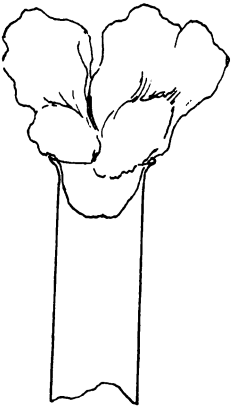


Abb. 10. Fehlerhafte Wattestopfen.

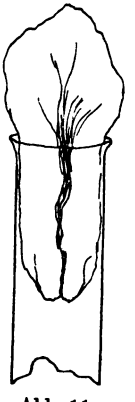


Abb. 11.

10. Abfüllen der Nährböden in die Gläser. In den bei der Herstellung der Fleisch-Nährböden nach §§ 6—9 verfügbaren Zwischenpausen werden die gereinigten und hinreichend abgetrockneten Reagenzgläser mit gut passenden Wattestopfen versehen. Diese sind (am besten aus gleichmäßigen, ungefähr 3 Finger breiten, 1 Finger langen Wattestreifen) derart anzufertigen, daß sie etwa 2—3 cm in das Glas hineinreichen und an der Mündung einen ebenfalls 2—3 cm im Durchmesser haltenden, gut geschlossenen, die Ränder des Glases vollkommen bedeckenden Bausch bilden (vergl. Abb. 9—11).

Digitized by Google

Die Stopfen dürfen weder zu locker, noch zu fest sitzen. Luftkeime sollen sicher ferngehalten werden, die Luft aber ziemlich ungehindert hindurchpassieren.

Die fertig filtrierten Nährböden werden in die Reagenzgläser abgefüllt. Etwa schon erstarrte Gelatine oder festgewordenes Agar sind durch kurzes Einstellen in den Dampftopf wieder zu schmelzen. In jedes Glas kommen ca. 8 ccm, die etwa $^1/_3$ des Raumes unterhalb des Wattestopfens einnehmen. Wir erhalten ungefähr 40 Gläschen Fleischgelatine, 25 Fleischagar, 15 Traubenzuckeragar und 35 Bouillon. Die gefüllten Gläser werden in Drahtkörbe eingestellt; auf beigelegten Zetteln ist genau anzugeben, was die Gläser enthalten.

Beim Eingießen von Gelatine und Agar ist ein Benetzen des oberen Teiles des Glases möglichst zu vermeiden, damit weiterhin der Wattestopfen nicht festklebt. Es gibt besondere Abfüllvorrichtungen, die aber völlig entbehrlich sind. Man halte das Glas senkrecht und lasse die Flüssigkeit aus einem nicht mehr als zur Hälfte gefüllten, mittelgroßen Becherglase (mit Ausguß) ruhig einlaufen. Die nötige Übung wird sehr bald erworben. Stellt es sich später heraus, daß die Stopfen doch teilweise festgeklebt sind, so halte man sich an folgende Regel:

Die Wattestopfen sind von den Gläsern durch seitliches Drehen (nicht durch geradliniges Ziehen) abzunehmen.

11. Sterilisieren der Fleischnährböden. Die in den gefüllten Gläschen enthaltenen Keime sind nun abzutöten. Zu diesem Zwecke wird die Bouillon und die Gelatine an drei aufeinander folgenden Tagen je 15 Minuten im strömenden Dampfe erhitzt.

Der Zweck dieser „diskontinuierlichen" Sterilisation ist der, den bei der ersten Erhitzung nicht getöteten Sporen Zeit und Gelegenheit zum Auskeimen zu geben. Die neugebildeten vegetativen

Digitized by Google

Formen werden beim zweiten oder beim dritten Erhitzen vernichtet.

Die Drahtkörbe mit den Gläsern sind nicht eher in den Dampftopf einzustellen, als bis volle Dampfentwicklung eingetreten ist.

Die Wattestopfen sind stets mit einem Stück Pergamentpapier zu überdecken, damit nicht Kondenswasser vom Deckel auf sie herabtropfen und sie durchnässen kann.

Auf naß gewordenen Wattestopfen keimen die aus der Luft auffallenden Schimmelpilzsporen leicht aus. Das auskeimende Mycel durchwächst den Wattestopfen und schnürt an dessen Unterseite wieder Sporen ab. Diese gelangen auf den sterilisierten Nährboden und rufen hier ein üppiges Pilzwachstum hervor.

Ist die Zimmertemperatur hoch, so muß die Gelatine in der Zwischenzeit an einem kühlen Orte (Luftschrank, Eisschrank oder dergl.) aufbewahrt werden.

Unnötig lange erhitzte oder warm gehaltene Gelatine verliert ihr Erstarrungsvermögen.

Fleischagar und Traubenzucker-Agar werden einmal im Autoklaven bis auf zwei Atmosphären Überdruck erhitzt. Vgl. hierzu die in § 8 angegebenen Regeln für die Benutzung des Autoklaven.

Einmaliges Erhitzen genügt, weil bei 130° C auch die Sporen getötet werden. Ist kein Autoklav vorhanden, so ist wie mit der Gelatine zu verfahren.

Das Traubenzucker-Agar läßt man dann (in den senkrecht stehenden Gläschen) gerade erstarren. Ebenso verfahren wir mit 15 Fleischagar-Röhrchen. Die übrigen 10 Gläser legen wir mit ihrem oberen Ende auf einen Stab, eine Holzleiste oder dergl., wie

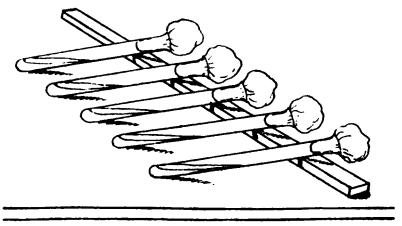


Abb. 12. Schräges Erstarren des Agars.

Digitized by Google

aus Abb. 12 zu ersehen ist. Das Agar erstarrt in diesem Falle in schräger Lage und erhält eine für Strichkulturen (§ 29) geeignete Flächenausdehnung. Nach dem Erstarren preßt das Agar stets etwas Wasser aus, das sich im unteren Teile des Glases als „Kondenswasser" ansammelt.

12. Milch. Zehn Reagenzgläser werden mit je ca. 8 ccm möglichst sauber gewonnener Magermilch gefüllt und an drei aufeinander folgenden Tagen je 30 Minuten im strömenden Dampfe erhitzt. Ein etwa verfügbarer Rest wird in einem genügend großen Kolben sterilisiert. Größere (langsamer zu durchwärmende) Quantitäten erfordern eine längere Dauer der jedesmaligen Erhitzung. Die vollkommen sterilisierte Milch ist in der Regel (infolge Änderung der Eiweißstoffe und Karamelisierung des Zuckers) bräunlich gefärbt.

Unsauber gewonnene Milch ist nur durch sehr häufiges und langes Erhitzen zu sterilisieren; mitunter gelingt dies überhaupt nicht. Am besten ist es, sich die nötige Menge Magermilch aus keimarmer Vorzugsmilch durch Zentrifugieren oder Aufrahmenlassen und Abhebern selbst zu beschaffen.

13. Kartoffeln. Zwei bis drei große, fleckenfreie Kartoffeln werden an der Wasserleitung sauber gewaschen und mit dem Taschenmesser unter Entfernung aller Unebenheiten geschält. Dann schneidet man sich längliche, keilförmige, in die Reagenzgläser passende Stücke zurecht und wirft diese in ein Becherglas mit Wasser. In 10 Reagenzgläser läßt man je ein kurzes Stück Glasrohr sowie ein Kartoffelstück hineingleiten und fügt aus der Spritzflasche einige Tropfen Wasser (zur Verhinderung des Austrocknens beim Sterilisieren) hinzu, doch nicht soviel, daß die Kartoffel direkt benetzt wird (Abb. 13).

Abb. 13. Kartoffelröhrchen.

Digitized by Google

Eventuell kann man sich auch mit dem Korkbohrer passende Kartoffelzylinder ausstechen, diese durch einen schrägen Schnitt halbieren und die Hälften in je ein Reagenzglas bringen.

Die Kartoffeln werden im Autoklaven (2 Atm.) sterilisiert. Ist ein solcher nicht vorhanden, so ist wie mit der Milch (§ 12) zu verfahren.

14. Aufbewahren der Nährböden. Die Gläser mit den fertigen Nährböden werden in die Aufbewahrungsgefäße gebracht. Auf beigelegten Zetteln ist Inhalt und Datum der Herstellung genau anzugeben.

Die Drahtkörbe sind nach beendeter Sterilisation stets sofort zu entleeren.

Die gefüllten Behälter dürfen nicht im Sonnenlicht und nicht nahe der Heizung stehen. Das Austrocknen der Substrate kann man dadurch verhindern, daß man unmittelbar nach dem letzten Sterilisieren den Wattestopfen mit einigen Tropfen $1^0/_{00}$ Sublimatlösung betupft und eine gut passende Gummikappe überzieht, die vorher eine Stunde in $1^0/_{00}$ Sublimatlösung gelegen hatte. Doch ist es im allgemeinen nicht zweckmäßig, unnötig viel Vorrat zu halten. Frisch bereitete Nährböden pflegen die besten Resultate zu geben.

Literatur zu §§ 4—14. Die betreffenden Kapitel in den auf S. 2 genannten Werken über allgemeine bakteriologische Technik, sowie in dem Grundriß der Bakteriologie von Lehmann und Neumann. Ragitnährböden wurden von E. Marx vorgeschlagen (Münchn. mediz. Wochenschr. 1910, S. 361).

III. Luftbakterien

Keimzählung. Kolonieformen

15. Vorbereitung. Zwei Petrischalen werden im Trockenschrank sterilisiert, in dem man die Temperatur bis auf 165—170° C steigen und etwa 5 Minuten einwirken läßt. Nach Erkalten des Schrankes werden sie herausgenommen

Digitized by Google

und auf die Tischplatte gestellt. Zwei sterilisierte[1]) Gelatineröhrchen werden durch Einstellen in ca. 40° C warmes Wasser zum Schmelzen gebracht, der Gasbrenner entzündet und in die Nähe der Petrischalen plaziert. Dann entfernt man aus dem einen, möglichst horizontal gehaltenen Gläschen (drehend!) den Wattestopfen, zieht die Mündung des Glases unter drehender Bewegung durch die Flamme, hebt mit der freien Hand den Deckel der Schale auf der einen Seite so hoch (aber nicht höher!) als nötig ist, um die Gelatine

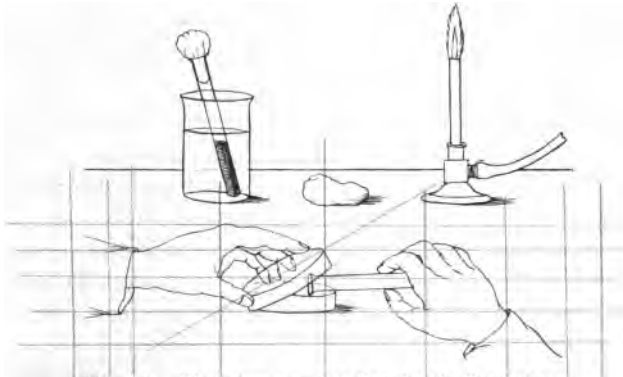


Abb. 14. Eingießen der Gelatine in die Petrischale.

in die Schale entleeren zu können (Abb. 14), schließt und bringt durch vorsichtiges Neigen die Gelatine zu gleichmäßiger Ausbreitung. Ebenso verfährt man mit dem zweiten Gläschen. Die Schalen bleiben unberührt auf einer ebenen Unterlage stehen, bis die Gelatine fest geworden ist.

---

[1]) Für den vorliegenden Fall genügt es, wenn die benutzten Gelatinegläschen nur einmal im Dampftopf erhitzt wurden. Wir brauchen deshalb mit diesem Versuch nicht zu warten, bis die Gelatine-Sterilisierung (gemäß § 11) vollständig durchgeführt ist.

Digitized by Google

Im Sommer muß die Unterlage (durch kaltes Wasser oder Eis) hinreichend abgekühlt sein. Die Gelatineschicht soll an allen Stellen ungefähr gleich dick sein, damit die Bakterien überall annähernd gleiche Entwicklungsbedingungen finden.

Die entleerten Gläser werden in einem besonderen Behälter aufbewahrt; später werden sie, wenn sich eine genügende Zahl angesammelt hat, wieder ausgekocht und von neuem verwendet. Ebenso werden die Wattestopfen, sofern sie nicht beschmutzt sind, zu gelegentlicher späterer Benutzung zurückgelegt.

16. Einfangen der Luftbakterien. Nachdem die Gelatine vollkommen erstarrt ist, wird je eine Schale in einem Raum mit keimarmer bezw. keimreicher Luft nach Abheben (nicht Umkehren!) des Schalendeckels eine bestimmte Zeit aufgestellt; z. B. in Stall $^1/_2$—2, im Laboratorium 5—20 Minuten. Nach Ablauf dieser Zeit schließt man die Schalen wieder, befestigt auf dem Deckel etwas seitlich von der Mitte eine Etikette mit dem nötigen Vermerk und verwahrt die beiden Schalen auf einem mit Glasglocke bedeckten Teller (nicht in der Sonne und nicht in der Nähe der Heizung!).

Teller und Glasglocke wischt man (zwecks oberflächlicher Sterilisierung und Anfeuchtung) mit einem in 1 $^0/_{00}$ Sublimatlösung getauchten Wattebausch aus. Die Gelatineschalen sind stets nur an den Schmalseiten zu fassen. Werden die (warmen) Finger an den Schalenboden gelegt, so schmilzt die Gelatine.

Die auf die Gelatineoberfläche gefallenen Keime entwickeln sich hier, soweit ihnen der Nährboden zusagt, in 1 bis 10 Tagen zu deutlich sichtbaren Kolonien (Tafel I, Abb. 1 und 2).

Selbstverständlich bekommt man bei diesem Verfahren nur einen Teil der Luftkeime zu Gesicht. Zur ungefähren Orientierung ist jedoch die Methode vollkommen ausreichend. Betreffs Prüfung des Einflusses der Luftkeime auf die Milch vergl. § 57.

Digitized by Google

17. Keimzählung. Die Zahl der Kolonien würde den wirklichen Keimgehalt nur unter zwei, niemals vollkommen erfüllten Voraussetzungen richtig erkennen lassen:

1. Alle in das Substrat gelangten Keime müßten darin Kolonien bilden.
2. Jede Kolonie müßte aus nur einem Keim hervorgegangen sein.

Tatsächlich kommen aber einerseits niemals sämtliche Keime zur Entwicklung; sei es, daß die Beschaffenheit des Substrats, die Stärke des Luftzutritts, die Höhe der Temperatur oder irgend ein anderer Umstand ihnen nicht zusagt. Andrerseits stellt sich bei der weiteren Prüfung der entstandenen Kolonien nicht selten heraus, daß sie aus verschiedenen Keimen hervorgegangen sind, die z. B. vereint einem Staubteilchen anhafteten.

Es kann und darf stets nur angegeben werden, wieviel Keime unter den innegehaltenen Versuchsbedingungen gezählt worden sind, nicht aber, wieviel vorhanden waren.

Zuweilen als notwendig erachtete, sehr weitgehende Genauigkeit beim Auszählen der Kolonien erscheint demgemäß nicht unbedingt geboten. Zur Erlangung brauchbarer Vergleichswerte ist es aber jedenfalls angezeigt, die Gelatinekulturen stets 8—10 Tage aufzubewahren. Kolonien von verflüssigenden Bakterien und Schimmelpilzen, welche dies bald unmöglich machen würden, sind (nach einem Vorschlage von Hiltner und Störmer) durch leichtes Betupfen mit einem Silbernitrat-Stift abzutöten, und zwar schon dann, wenn sie noch ganz klein sind. Späterhin ist der Erfolg zweifelhaft; die abfallenden Sporen der Schimmelpilze keimen von neuem aus und die verflüssigenden Enzyme der Bakterien wirken weiter.

Bei dem „Abstiften" der Kolonien darf der Deckel der Schale wie in allen Fällen nur so weit als eben nötig gelüftet werden.

Digitized by Google

Eventuell kann man auch so vorgehen, daß man von der in der linken Hand, mit der Schmalseite nach oben gehaltenen Schale den Deckel abhebt und auf die Tischplatte stellt, während die linke Hand gleichzeitig den Unterteil der Schale rasch umkehrt. So kann man sehr bequem die Kolonien von oben her betrachten und von unten her mit dem Silbernitrat-Stift leicht betupfen. Mehrere gleichzeitig mit derselben Aufgabe beschäftigte Praktikanten können sich zweckmäßig derart vereinen, daß einige die Kolonien rechtzeitig abtöten, während die anderen das Wachstum ungehindert fortschreiten lassen, um so die nach einigen Tagen (besonders bei Keimen aus der Stalluft) meist äußerst lebhafte Entwicklung und unter heftiger Gestankbildung vor sich gehende Gelatine-Zersetzung kennen zu lernen.

Die früher sehr gebräuchlichen Zählplatten sind aus dem angegebenen Grunde entbehrlich. Es genügt, wenn man zum Zählen die Schale umkehrt und auf der Unterseite die gezählten Kolonien durch Tintenpunkte markiert.

18. Kolonieformen. Besonders die dicht mit Bakterien und Pilzen (aus der Stalluft) besäeten Schalen pflegen einen guten Einblick in die mannigfaltigen Formen und Färbungen der Kolonien zu vermitteln. Die verschieden erscheinenden Kolonien sind (mittels Fett-Farbstift auf der Unterseite des Glases) mit Buchstaben oder Nummern zu bezeichnen und in ihrer Entwicklung von Tag zu Tag genau zu verfolgen. Unter der entsprechenden Bezeichnung sind in das Arbeitsjournal möglichst genaue, am besten von einfachen Skizzen begleitete Notizen einzutragen, aus denen deutlich hervorgeht, wie die betreffende Kolonie erstens bei der Betrachtung mit bloßem Auge (makroskopisch), zweitens bei schwacher Vergrößerung unter dem Mikroskop (ohne Beleuchtungsapparat!) ausgesehen hat. Im ersten Falle sind die Form und die optische Beschaffenheit, im letzten Falle die innere Struktur und das Aussehen der Randpartie ausführlich zu schildern (vergl. Abb. 15—18).

Digitized by Google

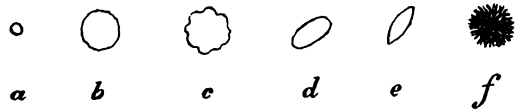


Abb. 15. Form der Kolonien:
a) kreisrund, b) scheibenförmig, c) unregelmäßig rundlich, d) oval, e) linsenförmig, f) verzweigt.

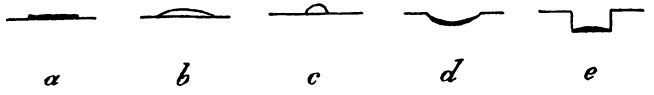


Abb. 16. Erhebung der Kolonien:
a) flach, b) erhaben, c) tropfenförmig, d) schalenförmig eingesunken, e) lochförmig eingesunken.

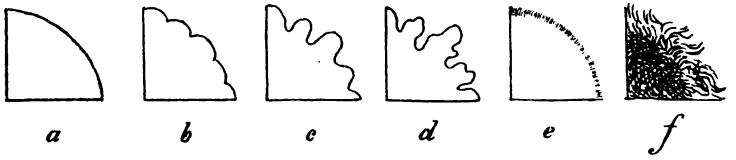


Abb. 17. Rand der Kolonien:
a) glatt, b) gekerbt, c) gebuchtet, d) ungleichmäßig gelappt, e) haarartig, f) gelockt.

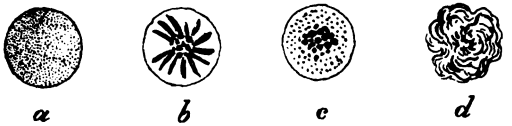


Abb. 18. Innere Struktur der Kolonien:
a) granuliert, b) radiär gestreift, c) gefleckt, d) unregelmäßig gefurcht.

Digitized by Google

Insbesondere ist anzugeben, ob die Kolonien durchsichtig, durchscheinend oder undurchsichtig sind, ob sie irisieren, opaleszieren, mehr oder minder stark glänzen, ob sie porzellanartig oder von kreidiger Beschaffenheit, ob sie gleichmäßig, oder in Zonen oder sonst unregelmäßig gefärbt erscheinen. Eine etwa vorhandene Verflüssigungszone kann entweder klar, oder gleichmäßig getrübt sein, oder die Kolonie hat sich darin in mehr oder minder großen Krümeln oder Brocken aufgelöst. Beim Abimpfen der Kolonien (§ 21) ist festzustellen, ob sie eine wässerige, schleimige, fadenziehende oder knorpelige Konsistenz besitzen, ob sie in Form von zähen Häuten vom Substrat abgehoben werden können oder andere bemerkenswerte Eigenschaften in dieser Richtung aufweisen.

IV. Wasserbakterien. Bakterien-Isolierung

19. Vorbereitung. Zwei Reagenzgläser werden mit je 9 ccm Leitungswasser gefüllt und mit Wattestopfen versehen. Drei 1 ccm-Pipetten werden in ein großes Reagenzglas gestellt, dessen Mündung ebenfalls mit Watte verschlossen wird. Es schadet nichts, wenn der obere, später zum Ansaugen benutzte Teil der Pipetten ein Stück aus der Watte hervorragt; man kann eine Kappe von Pergamentpapier darüber stülpen und so einer etwaigen Infektion des inneren Pipettenteiles durch Keime aus der Luft vorbeugen. Das große und die beiden kleinen Reagenzgläser werden im Autoklav auf $1^1/_2$ Atmosphären Überdruck oder zwei Stunden im strömenden Dampf erhitzt[1]). Ferner sind drei Petrischalen im Trockenschrank zu sterilisieren. Leitungswasser wird unter möglichstem Ausschluß aller Fremdinfektionen (Abflammen des Hahnes und längeres Ablaufenlassen bei voll geöffnetem Hahn) in einem (im Trocken-

[1]) Bei dem an sich ebenfalls zulässigen Sterilisieren der Pipetten im Trockenschrank wird das Glas meist nach verhältnismäßig kurzer Zeit mehr oder minder stark angegriffen.

Digitized by Google

schrank) sterilisierten Becherglas aufgefangen und bereitgestellt. Eventuell kann auch das im Laboratorium vorrätig gehaltene destillierte Wasser zur Untersuchung herangezogen werden.

Gutes Leitungswasser enthält in der Regel nur wenige Keime, dagegen sind ausschließlich für Gebrauchszwecke bestimmte Wässer, ebenso wie längere Zeit aufbewahrtes, destilliertes Wasser oft sehr keimreich. Für solche Fälle muß man sich durch Bereitstellen einer größeren Zahl von Reagenzgläsern mit je 9 ccm sterilisiertem Wasser und von mehr sterilisierten Pipetten auf eine größere Zahl Verdünnungen (§ 20) einrichten. Die zweckmäßigste Art der Probenahme hat sich nach den Umständen zu richten; für Ausschluß von Fremdinfektionen und Kühlhalten der Proben bis zu der (möglichst bald vorzunehmenden) Verarbeitung ist jedenfalls zu sorgen.

20. Anfertigung der Verdünnungen und der Gußkulturen. Drei Gelatineröhrchen werden in einem mit warmem Wasser gefüllten Becherglas zum Schmelzen gebracht. Von dem zu untersuchenden Wasser wird — nach Umschütteln! — mittels der einen der sterilisierten Pipetten zunächst 1 ccm in das eine mit I (d. h. I. Verdünnung) zu bezeichnende Reagenzglas übertragen und unmittelbar danach 1 ccm in die eine mit O (d. h. Original) zu bezeichnende Petrischale (unter geringem Anheben des Deckels!). Das mit 1 ccm beschickte, sofort wieder zu verschließende Reagenzglas wird kräftig geschüttelt. Mit der zweiten sterilisierten Pipette wird aus der I. Verdünnung 1 ccm in das zweite Reagenzglas (II) und 1 ccm in die zweite Schale gegeben (I. Verdünnung = $^1/_{10}$ Original); ebenso aus dem Reagenzglas II nach kräftigem Durchschütteln 1 ccm in die dritte Schale (II. Verdünnung = $^1/_{100}$ Original). In jede Schale wird ein Gelatinegläschen entleert und jedesmal sofort Wasser und Gelatine durch vorsichtiges Hin- und Herneigen solange vermischt, bis keine „Schlieren“ mehr zu

Digitized by Google

sehen sind. Dann läßt man erstarren, bringt die Schalen unter die Glasglocke und verfährt, wenn die Kolonien (nach 2—4 Tagen) sichtbar geworden sind, nach §§ 17 und 18.

Für genauere Untersuchungen sind natürlich Parallelkulturen unentbehrlich. Eine mitunter angezeigte Prüfung auf anaërobe Bakterien ist derart auszuführen, daß das Wasser in drei vorher geschmolzene und auf 50° C abgekühlte Agarröhrchen eingetragen, darin durch Hin- und Herneigen (nicht Schütteln!) gründlich verteilt und im übrigen nach den in § 41 mitgeteilten Regeln der Anaërobenzüchtung verfahren wird. Wegen spezieller Prüfung des Wassers für Molkereizwecke vergl. §§ 57 und 58.

21. Bakterien-Isolierung. Die bei der direkten Aussaat der Keime (aus Luft, Wasser usw.) entstehenden Kolonien sind oft nicht aus einem Keim hervorgegangen, sondern stellen *Mischkulturen* dar. Um *Reinkulturen* zu erlangen, verfährt man in folgender Weise:

Von jeder zu näherer Untersuchung bestimmten Kolonie (z. B. zwei von der Luft- und zwei von der Wasser-Gußkultur) wird zunächst in je ein Gläschen mit Bouillon „übergeimpft". In der Flamme glüht man die (nahezu senkrecht nach unten gehaltene) Platinnadel in ihrer ganzen Länge aus; ebenso sterilisiert man durch drehendes Hin- und Herbewegen den (jetzt horizontal gehaltenen) anschließenden Teil des Glasstabes (etwa 10 cm) in der Flamme. Dann läßt man — Spitze der Nadel nach oben! — ca. 20—30 Sekunden erkalten, entnimmt (unter geringem Anheben des Deckels) eine ganz kleine (kaum sichtbare) Bakterienmenge von der betreffenden Kolonie und überträgt sie in ein möglichst horizontal gehaltenes Gläschen Bouillon, dessen Wattestopfen man mit dem dritten und vierten Finger der rechten Hand derart herausgenommen hat, daß der ins Glas gehörige Unterteil zwischen den Fingern frei nach außen hervorragt. Die Mündung des Gläschens

Digitized by Google

ist abzuflammen; die an der Nadel befindliche Bakterienmasse wird dicht über der Bouillon an der Glaswand verrieben und mit der Bouillon vermischt. Nach abermaligem Durchziehen der Mündung durch die Flamme wird der Wattestopfen wieder aufgesetzt und die Platinnadel wie vorher ausgeglüht. Das Bouillonröhrchen wird entsprechend etikettiert und 1—2 Tage hingestellt, bis eine deutliche Trübung oder ein reichlicher Bodensatz darin wahrzunehmen ist.

Die Platinnadel bezw. die Platinöse ist stets unmittelbar vor wie nach dem Gebrauche in ihrer ganzen Länge auszuglühen. Ebenso ist der angrenzende Teil des Glasstabes, soweit er in die Kulturgefäße eingeführt wird in der Flamme sorgfältig zu sterilisieren.

Beim Überimpfen ist die Mündung der Gläser stets möglichst tief zu halten. Desgleichen ist es, zwecks Fernhaltung von Fremdinfektionen, notwendig, daß die Luft im Arbeitsraume möglichst keimarm und unbewegt sei. Etwa den Mündungen anhaftende Keime sind durch Abflammen der oberen Glasteile vor wie nach dem Impfen abzutöten.

Für jede genügend entwickelte Bouillonkultur sind je drei sterilisierte Petrischalen und drei geschmolzene Gelatineröhrchen (im Becherglas mit warmem Wasser) zurechtzustellen. Man glüht die Platinnadel aus, hält sie nach außen gekehrt zwischen zweitem und drittem Finger, klemmt das (vorher geschüttelte!) Bouillongläschen zwischen zweiten und dritten, und eines von den geschmolzenen Gelatineröhrchen zwischen ersten und zweiten Finger der linken Hand (beide in möglichst horizontaler Lage). Sodann bringt man den Wattestopfen des Gelatinegläschens zwischen dritten und vierten, den des Bouillongläschens zwischen vierten und fünften Finger der linken Hand, und zwar derart, daß der ins Glas gehörende Teil frei nach außen ragt

Digitized by Google

(also nicht von den Fingern infiziert werden kann). Jetzt zieht man die Mündungen der beiden Gläser durch die Flamme, taucht den Platindraht der ganzen Länge nach in die Bouillon, läßt ihn einige Sekunden darin verweilen, führt ihn dann rasch aus dem Bouillongläschen in die Gelatine und verteilt hier die mitgeführten Keime durch kräftiges Hin- und Herbewegen der Nadel (Abb. 19). Nach abermaligem raschen Durchziehen der oberen Glasteile durch die Flamme werden die Wattestopfen auf das geimpfte Gelatinegläschen und auf das Bouillonröhrchen aufgesetzt, die Nadel wird ausgeglüht und die Bouillon beiseite gestellt. Jetzt wird die Platinöse zur Hand genommen und nach Vorschrift ausgeglüht. In analoger Weise wie vorher wird das infizierte Gelatinegläschen zwischen zweiten und dritten, das neu zu impfende zwischen ersten und zweiten Finger geklemmt, die Wattestopfen an den richtigen Platz gebracht und eine Platinöse voll der geimpften Gelatine (I. Verdünnung) in das neu hinzugenommene Gläschen (II. Verdünnung) übertragen. Durch leichtes Anschlagen an die Glaswand dicht oberhalb der Gelatine wird

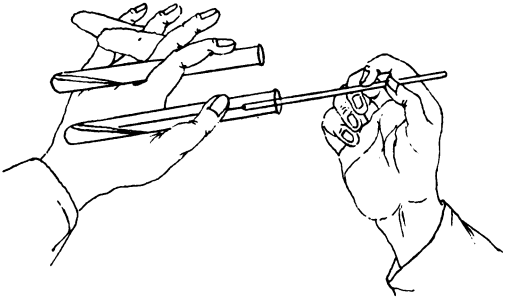


Abb. 19. Überimpfen und Anlegen von Verdünnungen in Reagenzgläsern.

Digitized by Google

die Öse entleert und durch rasches Hin- und Herbewegen des Platindrahtes das Impfmaterial gründlich verteilt. Die Gläschen werden verschlossen und die Platinnadel ausgeglüht. Zuletzt wird die III. Verdünnung in der entsprechenden Weise angefertigt und die drei Gläschen (nach Abglühen der Mündungen) in die entsprechend bezeichneten Petrischalen entleert.

Das Impfverfahren ist nach kurzer Übung ohne jede Schwierigkeit ausführbar und weit einfacher im Gebrauch als dies beim ersten Durchlesen der Vorschrift erscheinen mag. — Das Verteilen der Keime in der flüssigen Gelatine darf nicht durch Schütteln geschehen. Die entstehenden Luftblasen würden das Aussehen der Gußkulturen beeinträchtigen.

Die Gußkulturen werden nach dem Festwerden in bekannter Weise aufbewahrt und weiterhin nach § 18 untersucht. In wirklichen Reinkulturen müssen die an der Oberfläche bezw. die im Substrat und die etwa am Boden (zwischen Nährboden und Glas) zur Entwicklung kommenden Kolonien (sog. Oberflächen-, Tiefen- und Bodenkolonien) jedesmal unter sich bei makroskopischer wie bei mikroskopischer Betrachtung ein übereinstimmendes Bild liefern.

Die Tiefenkolonien bleiben in der Regel sehr klein und sind bei den meisten Bakterienarten einander ziemlich ähnlich, dagegen von den zugehörigen Oberflächenkolonien in der Regel sehr verschieden. Etwa vorhandene (verhältnismäßig selten auftretende) Bodenkolonien ähneln wieder mehr den Oberflächenkolonien.

Nach genügender Entwicklung wird von je einer gut isoliert liegenden Kolonie in Bouillon abgeimpft und diese Kulturen zu eingehenden mikroskopischen und kulturellen Prüfungen (Kap. V und VI) verwendet.

Zur Reinigung legt man die gebrauchten Petrischalen (beide Hälften mit der flachen Seite nach unten) in einen Topf mit Wasser, kocht und spült nach dem Erkalten unter der Wasserleitung gründlich ab.

Digitized by Google

V. Mikroskopische Prüfung

22. Herstellung gefärbter Ausstrichpräparate. Eine Anzahl Objektträger und Deckgläser, die einige Zeit in einer etwa zur Hälfte mit salzsaurem Xylol-Alkohol-Gemisch gefüllten Schale gelegen haben, werden mittels eines weichen (nicht fasernden) Tuches getrocknet und blank geputzt. Der Deckel der Xylol-Alkohol-Schale ist stets sofort wieder zu schließen. Die gereinigten Gläser werden auf einen Streifen Filtrierpapier, in eine saubere Schale oder dergl. gelegt.

Die Anfertigung und Färbung der Ausstrichpräparate geschieht folgendermaßen:

1. Aus einer der Bouillonkulturen überträgt man (unter Innehaltung der bekannten Vorsichtsmaßregeln) eine Öse voll auf einen zurechtgelegten Objektträger und *streicht* das Material derart *aus*, daß es einen reichlich 1 qcm großen quadratischen Flächenraum ganz gleichmäßig bedeckt.

2. In wenigen Augenblicken ist das Präparat *lufttrocken* geworden. Durch sehr schwaches Anwärmen über kleiner Flamme kann das Antrocknen nötigenfalls beschleunigt werden.

3. Man *fixiert* das Präparat, indem man den Objektträger seitlich an den Kanten zwischen Daumen und Zeigefinger faßt und die mit den Bakterien bedeckte Stelle (Schicht nach oben) 4—5 mal ruhig (etwa im Sekundenmaß) durch den heißesten Teil der Gasflamme zieht. Infolge Festbrennens des Bakterienschleimes bleiben die Keime bei der weiteren Behandlung am Glase haften.

4. Die Bakterien werden *gefärbt*, indem man eine wässerige Anilinfarblösung (Viktoriablau) auf die betreffende Stelle aufträgt und etwa 30 Sekunden einwirken läßt.

Digitized by Google

5. Nach Abgießen der Farblösung folgt gründliches *Abspülen* mit Wasser (aus der Spritzflasche oder unter der Leitung).

6. Der Objektträger wird *getrocknet*, indem man die zurückgebliebenen Tropfen durch Betupfen mit Filtrierpapier entfernt und dann über der Sparflamme vorsichtig nachwärmt, bis die letzte Spur von Feuchtigkeit verschwunden ist.

7. Zum *Einschließen* des Präparats bringt man — aus dem sofort wieder zu schließenden Fläschchen — einen etwa 3 mm im Durchmesser haltenden Tropfen Canadabalsam (Koniferenharz in Xylol gelöst) mitten auf die Bakterienschicht und legt ein Deckglas auf.

Der Balsam darf nicht sauer reagieren; nötigenfalls ist pulverisiertes Natriumkarbonat hinzuzufügen, das Gemisch längere Zeit unter wiederholtem Umschütteln in der Wärme aufzubewahren und schließlich das Karbonat durch Absitzenlassen vom Balsam zu trennen.

Etwa im Balsam vorhandene Luftblasen beseitigt man (vor Auflegen des Deckglases) durch Berühren mit der heißen Platindrahtspitze.

Der Balsam breitet sich von selbst gleichmäßig aus, nötigenfalls kann durch schwaches Anwärmen über der Sparflamme nachgeholfen werden. Hatte der Tropfen die richtige Größe, so füllt der Balsam den Zwischenraum zwischen Deckglas und Objektträger vollständig aus, ohne an den Seiten hervorzuquellen, was sorgfältig zu vermeiden ist.

Die wässerigen Anilinfarblösungen werden derart hergestellt, daß man zunächst eine konzentrierte alkoholische Stammlösung bereitet (soviel trockener Farbstoff wird in einer Flasche mit Alcohol absolut. übergossen, daß ein ungelöster Rest verbleibt). Diese wird in dem zum Handgebrauch bestimmten Fläschchen mittels destillierten Wassers annähernd 10-fach verdünnt. Die wässerigen Lösungen zersetzen sich mit der Zeit und müssen dann (nach gründlicher Reini-

Digitized by Google

gung der Flaschen) erneuert werden. Von den sehr zahlreichen Farblösungen kommen für unsere Zwecke zunächst nur Viktoriablau und Methylenblau in Betracht. Dieses färbt weniger intensiv als jenes.

Die Färbbarkeit der Bakterien ist ungleich. Zuweilen muß die oben angegebene Färbezeit verlängert oder es müssen besondere Färbungsmethoden benutzt werden, worüber an späteren Stellen das Nötige mitgeteilt werden wird.

Stellt sich bei der Betrachtung (vgl. § 23) heraus, daß das Präparat nicht gut gelungen ist, was im Anfang häufig der Fall zu sein pflegt, so legt man es in die saure Xylol-Alkohol-Mischung, die in kurzer Zeit den Balsam löst und die Farben zerstört. Nach einigen Wiederholungen erhält man bald Präparate, die den zu stellenden Anforderungen genügen: erstens müssen sie von fremden Beimengungen möglichst frei sein; zweitens dürfen sie weder zu viel noch zu wenig Bakterien enthalten; drittens sollen diese gleichmäßig verteilt liegen und gut gefärbt erscheinen (Abb. 20).

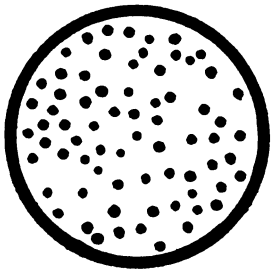


Abb. 20.
Gefärbtes Ausstrich-Präparat. Luftbakterien. Vergr. 1:1200.

Eventuell kann man das Einschließen des Präparats zunächst ganz unterlassen und erst nachträglich (nach Entfernung des Immersionsöles mittels Xylol, vergl. § 23) vornehmen, wenn das betreffende Präparat des Aufhebens wert erscheint. Zur Aufbewahrung bestimmte Präparate sind mit Etiketten zu versehen, die über alles Wissenswerte genaue Auskunft geben. Der Canadabalsam erhärtet in einiger Zeit vollständig; er kann aber jederzeit mit Xylol wieder gelöst werden. Nach gründlicher Reinigung (mit Xylol) können im Laufe der Zeit verblaßte Dauerpräparate von neuem gefärbt werden. Für längere Aufbewahrung ist der Gebrauch von Präparatenkästen empfehlenswert.

Digitized by Google

23. Anwendung des Immersionssystems. Bei der Untersuchung von Bakterienpräparaten macht sich meist eine 600- bis 1000-fache Vergrößerung nötig. Trockensysteme geben in solchen Fällen nur dann ein gutes Bild, wenn besondere (relativ teure) Gläser, sog. Apochromate, zur Verfügung stehen. In der Regel wird die *Öl-Immersion* benutzt, die in Verbindung mit dem *Abbeschen Beleuchtungsapparat* ein besonders helles und scharfes Bild liefert. Das Zedernholzöl, das in diesem Falle Präparat und Objektiv verbindet, besitzt den gleichen Brechungsexponenten wie

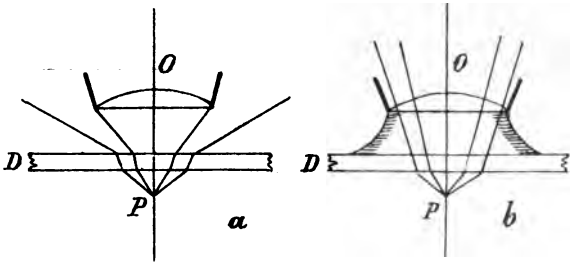


Abb. 21. Gang der Lichtstrahlen a) beim Trockensystem, b) beim Öl-Immersionssystem vom Präparat (P) durch das Deckglas (D) in das Objektiv (O).

das Glas. Die das Präparat durchdringenden Lichtstrahlen werden infolgedessen mehr zusammengehalten als bei Anwendung des Trockensystems (vgl. Abb. 21).

Bei der Benutzung des Immersionssystems ist folgendermaßen zu verfahren:

1. Aus dem — sofort wieder zu schließenden — Zedernöl-Fläschchen bringt man einen etwa 3 mm im Durchmesser haltenden Tropfen auf das Deckglas (bezw. auf das Präparat).

2. Man legt das Präparat mitten auf den Objekttisch und senkt den Tubus des Mikroskops unter Benutzung des

Digitized by Google

groben Triebs zunächst gerade soweit, daß die Frontlinse des Immersions-Objektivs in den Öltropfen eben eintaucht.

3. Unter genauem Zusehen von der Seite her und unter gleichzeitigem, mäßigen Hin- und Herbewegen des Präparats schraubt man vorsichtig (ganz langsam!) in der gleichen Richtung weiter, bis die Linse das Präparat lose berührt, so daß das Verschieben gehemmt wird.

Jede stärkere Berührung von Linse und Präparat ist streng zu vermeiden.

4. Jetzt bringt man das Auge an das Okular und stellt Spiegel und Blende derart ein, daß das Gesichtsfeld möglichst hell erscheint. Für Tageslicht benutzt man den Plan-, für künstliches Licht den Hohlspiegel.

5. Dann schraubt man den Tubus (in der entgegengesetzten Richtung als vorher) ganz langsam empor (das Triebrad darf sich in der Sekunde nur um Bruchteile von Millimetern drehen!) und bewegt gleichzeitig mit der anderen Hand das Präparat mäßig hin und her (in Bewegung begriffene Gegenstände werden leichter gesehen).

6. In dem Moment, in dem das Bild im Gesichtsfelde erscheint, verläßt die Hand den groben Trieb und geht an die Mikrometerschraube, mit deren Hilfe das Bild scharf eingestellt wird.

7. Nötigenfalls ist die Beleuchtung durch Stellungsänderung von Spiegel, Blende und Beleuchtungsapparat noch zu vervollkommnen. Seitliche Verschiebungen des Präparates werden jetzt am besten nicht mehr durch direktes Bewegen des Objektträgers, sondern durch Verstellen des Objekttisches bewirkt, sofern dieser darauf eingerichtet ist.

Man gewöhne sich daran, bei der Betrachtung des Präparates die Mikrometerschraube andauernd zu benutzen und das nicht beschäftigte Auge nicht fest zu schließen.

Digitized by Google

Die Okulare dürfen nur im Notfalle und nur mit größter Vorsicht, die Objektive überhaupt nicht auseinandergeschraubt werden.

Einzelheiten über Gebrauch und Wirkung des Mikroskops sind in den betreffenden Kapiteln der auf S. 2 angegebenen Lehr- und Handbücher über mikroskopische Technik nachzulesen. Auch hier ist Übung die Hauptsache.

Von den zur Aufbewahrung bestimmten Präparaten wird das Öl mittels Fließpapier leicht abgetupft. Der Rest trocknet langsam ein. Vor einer späteren Betrachtung wird er durch Xylol entfernt, ehe von neuem ein Öltropfen aufgebracht wird.

Nach jedesmaliger Beendigung der mikroskopischen Arbeiten ist die Immersionslinse mit einem mit einer Spur Xylol befeuchteten feinen Tuche vorsichtig von dem anhaftenden Öl zu befreien. Viel Xylol löst den Linsenkitt!

Sobald die Mikroskope nicht mehr gebraucht werden, sind sie in die Schränke zurückzubringen.

24. Tusche-Ausstrichpräparate. Das Färben der Bakterien stellt eigentlich nur einen Notbehelf dar, dessen wir uns oft bedienen, da die direkte Beobachtung der lebenden Bakterien, besonders wenn es sich um bewegliche Formen handelt, nicht selten ziemlich schwierig ist, weshalb sie auch hier vorläufig zurückgestellt wurde (s. § 25). Durch das Fixieren, Färben usw. werden aber Gestalt und Struktur mehr oder weniger stark verändert. Die Betrachtung des ungefärbten, trockenen Ausstrichpräparats ist nur in Ausnahmefällen anwendbar (vefgl. § 88). In vorzüglicher Weise wird dagegen die Untersuchung der ungefärbten Bakterien ermöglicht, wenn man diese in Tusche einbettet; sie erscheinen als helle Gebilde auf dunklem Grunde (vergl. Taf. I, Abb. 3). Die Anfertigung des Tusche-Ausstrichpräparates geschieht in der Weise, daß man dem auf den Objektträger aufgetragenen bakterienhaltigen Tropfen eine Öse voll sterili-

Digitized by Google

sierter Tusche (von Grübler & Co in Leipzig) hinzufügt und möglichst gleichmäßig ausstreicht[1]). In wenigen Augenblicken ist das Präparat trocken; bei richtiger Anfertigung muß es, gegen weißes Papier gehalten, dunkelgrau durchscheinen. Das Einschließen in Kanadabalsam erfolgt wie beim gefärbten Präparat; auch das Tuschepräparat kann direkt (ohne Deckglas) mit dem Immersionssystem geprüft werden. Fast immer finden sich neben zu dicken und zu dünnen Stellen solche, die ein sehr klares Bild liefern. Besonders empfiehlt sich die Anwendung dieser durch größte Einfachheit ausgezeichneten Methode, wenn Material aus Bouillon, Milch u. dergl. mikroskopiert werden soll, vorhandene Fremdkörper aber das gefärbte Präparat sehr unsauber erscheinen lassen. Nicht brauchbar ist das Verfahren, wenn starke Schleimbildung im Substrat stattgefunden hat.

Literatur: Burri, Das Tuscheverfahren 1909.

25. Beobachtung im hängenden Tropfen. Aus einer Bouillonkultur wird eine Platinöse voll Material auf ein auf der Tischplatte liegendes, nicht völlig fettfreies Deckglas aufgetragen, so daß ein kleiner, flacher Tropfen von 2 bis 3 mm Durchmesser entsteht. Ein geringer Fettgehalt ist nötig, um das Breitlaufen zu verhindern; eventuell genügt ein vorheriges, leichtes Überstreichen mit dem Finger. Mit der Platinnadel setzt man an vier Stellen des Randes der Vertiefung eines hohlgeschliffenen Objektträgers kleinste Tröpfchen Kanadabalsam oder Vaseline. Den umgekehrten Objektträger drückt man nun behutsam derart gegen die

[1]) Gewöhnliche Tusche ist meist bakterienhaltig. Sie muß im strömenden Dampf sterilisiert und der Sedimentierung überlassen werden, so daß sie eine homogene Suspension feinster Teilchen liefert. Die Entnahme der Tropfen muß stets aseptisch erfolgen; das Tuschegläschen ist von Zeit zu Zeit, nach Ersatz des verdunsteten Wassers, wieder zu sterilisieren.

Digitized by Google

Ecken des Deckglases, daß diese durch den Balsam (oder die Vaseline) festgehalten werden und der Tropfen frei in den Hohlraum hineinragt (Abb. 22).

Ist der Tropfen zu groß, so berührt er den Objektträger; die mikroskopische Beobachtung ist dann unmöglich. Die Verwendung größerer Mengen Kanadabalsam oder Vaseline bedingt völligen Luftabschluß des Hohlraumes. Sehr sauerstoffbedürftige, bewegliche Bakterien stellen in diesem Falle bald ihre Beweglichkeit ein.

Jetzt wird — um ein Abfließen des Tropfens zu verhindern — rasch umgewendet und auf das Deckglas ein Tropfen Zedernholzöl aufgetragen. Beim Niederschrauben

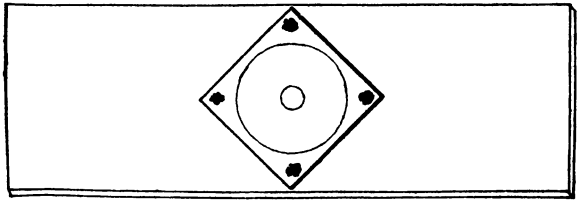


Abb. 22. Hohlgeschliffener Objektträger mit hängendem Tropfen. Natürl. Größe.

des Mikroskops ist wie vorher (§ 23) zu verfahren, doch ist hier ganz besondere Sorgfalt erforderlich, um das hohl liegende Deckglas nicht durchzudrücken. Die Beleuchtung wird derart reguliert, daß man zwar auch zunächst — am besten unter Benutzung einer kräftigen künstlichen Lichtquelle (elektrische Glühlampe oder Gas-Mikroskopierlampe) und des Hohlspiegels — maximale Beleuchtung herstellt, dann aber die Blende soweit schließt, daß das Gesichtsfeld hellgrau erscheint. Nun hebt man den Tubus unter stetem Hin- und Herbewegen des Präparates ganz langsam an; sobald ein schwach sichtbares Bild erscheint, geht die Hand an die Mikrometerschraube. Nach scharfer Einstellung wird

Digitized by Google

das Präparat — unter andauernder Bewegung der Mikrometerschraube — soweit seitlich verschoben, bis der Tropfenrand im Gesichtsfelde erscheint. Hier sind die Bakterien bei richtiger (auszuprobierender!) Spiegelstellung und Blendenöffnung meist recht gut zu sehen (vergl. Tafel I, Abb. 4). Insbesondere kann hier entschieden werden, ob die Keime in der betreffenden Kultur aktiv beweglich sind oder nicht. Im Innern des Tropfens sind in der Regel auch unbewegliche Bakterien infolge der Brownschen Molekularbewegung in scheinbarer Bewegung. Doch handelt es sich in diesem Falle um ein besonders an Bakterien-Konglomeraten deutlich erkennbares Schwingen und Tanzen fast ohne Ortsveränderung, das auch andre feinste Körperchen (Tuscheteilchen usw.) unter diesen Bedingungen zeigen. Wirklich bewegliche Formen sieht man am Tropfenrand mehr oder minder rasch hin- und hereilen, so daß ein Zweifel über die Beweglichkeit nur in verhältnismäßig seltenen Fällen (bei sehr langsam beweglichen Arten) bestehen bleibt.

Die Beobachtung der Bakterien im hängenden Tropfen erfordert entschieden mehr Geduld und Übung als die Betrachtung des gefärbten oder des Tusche-Ausstrichpräparates. Ist ein Wechsel des Präparates beabsichtigt, so braucht man nur das Deckglas vorsichtig (durch Anfassen an der oberen und der unteren Ecke) abzuheben. Der Objektträger kann sogleich weiter verwendet werden; das Deckglas kommt in die Xylol-Alkohol-Schale.

26. Bakterienmessungen. Das gefärbte oder das lebende Präparat wird in gewohnter Weise eingestellt. In das hierfür bestimmte Okular wird das Mikrometer eingelegt und nun festgestellt, wie breit und lang die betreffenden Bakterien im Vergleich zu den Strichen des Mikrometers erscheinen. Nach der jedem Mikroskop beigegebenen Tabelle erfolgt dann die Umrechnung.

Digitized by Google

Wenn z. B. gemessen wurde, daß die Länge der untersuchten Formen 1—1½ und die Breite ¼ Mikrometerteil entspricht, der Mikrometerwert aber für die betreffende Vergrößerung 1,65 μ beträgt, so ergeben sich als wirkliche Größenmaße 0,8 : 1,65—2,5 μ. Um die richtigen Grenzwerte zu erhalten, sind selbstverständlich Prüfungen einer hinreichend großen Zahl von Bakterien erforderlich. Gefärbt erscheinen diese (infolge Schrumpfung beim Trocknen und Fixieren) in der Regel ein ganzes Stück kleiner als im lebenden Zustande. Deshalb müssen die Messungen stets an Präparaten beiderlei Art ausgeführt werden.

27. Geißelpräparate. Eine gute Sichtbarmachung der Bakteriengeißeln ist im allgemeinen recht schwierig und zeitraubend. Deshalb pflegt man auch im agrikultur-bakteriologischen Laboratorium mit Recht derartige Präparate gewöhnlich nur dann anzufertigen, wenn es sich um die genaue Erforschung einer unbekannten Art handelt. Die Zahl der vorgeschlagenen Methoden ist relativ groß; keine von ihnen gibt stets zufriedenstellende Resultate. Man kann z. B. folgendermaßen verfahren:

Einige saubere Deckgläser werden im Becherglas 10 Minuten in 5proz. Natronlauge gekocht. Nach dem Abkühlen werden sie in destilliertem Wasser abgespült und 10 Minuten in 10-proz. Salzsäure gekocht. Dann folgt abermaliges Spülen in destilliertem Wasser, danach in Äther-Alkohol-Gemisch. Die zum Fassen der Deckgläser benutzte Pinzette muß vollkommen rein sein.

Aus dem Kondenswasser einer 12—24 Stunden alten, bei 38° C gehaltenen Agarkultur (s. § 28) einer im hängenden Tropfen als beweglich erkannten Bakterienart wird eine Öse voll in einen Tropfen Leitungswasser übertragen, der sich auf einem Objektträger befindet. Wasser und Objektträger wärmt man zweckmäßig vorher im Brutschrank an. Ohne zu verrühren, läßt man die Bakterien sich verteilen und etwaige Konglomerate sich absetzen. Nach einigen Minuten bringt man von der Aufschwemmung je eine Öse voll auf die vorbereiteten Deckgläser; das Tröpfchen muß sich von selbst sofort ausbreiten. Die in eine Schale gelegten, beschickten Deckgläser werden gleich wieder in den Brutschrank gestellt; am besten arbeitet man gleich darin. Nach dem Antrocknen folgt das Beizen, wozu man sich der von

Digitized by Google

Bunge angegebenen Beize bedienen kann: 25 ccm einer 25-proz. Eisenchloridlösung werden mit 75 ccm einer konz. wässerigen Tanninlösung vermischt; nach mehrere Tage oder Wochen dauernder Aufbewahrung ist die Flüssigkeit gebrauchsfertig. Die durch einen kleinen Trichter auf das Präparat auffiltrierte Beize läßt man unter schwachem Erwärmen 1—2 Minuten einwirken, dann wird sauber abgespült und getrocknet. Weiterhin färbt man, ebenfalls unter gelindem Erwärmen 1—2 Min. mit Karbolfuchsin (1 Teil konz. alkoh. Fuchsin + 9 Teile 5-proz. wässerige Karbolsäurelösung). Schließlich folgt in bekannter Weise Abspülen, Trocknen und Einschließen. Um recht saubere Präparate zu erhalten, kann man sie vor dem Beizen und nach dem Färben mit schwacher Essigsäure behandeln (vgl. § 37).

Literatur: Die betreffenden Kapitel in den auf S. 2 genannten Lehr- und Handbüchern für mikroskopische und allgemeinbakteriologische Technik, ferner Lehmann und Neumann, Grundriß der Bakteriologie.

VI. Kulturelle Prüfung

28. Plattenkulturen. Die Isolierung der Bakterien wurde zuerst (von R. Koch und dessen Schülern) derart ausgeführt, daß man die geimpfte Gelatine auf Glasplatten ausgoß. Auch die jetzt fast ausschließlich in Petri-Schalen angelegten Gußkulturen bezeichnet man deshalb noch oft als „Plattenkulturen". Zur Herstellung dient Gelatine (§ 21) oder Agar (§ 34). Über das Aussehen der Kolonien wurde bereits (§§ 18 und 21) gesprochen. Die Reinkultur-Platten der Luft- und Wasserbakterien sind in ihrer fortschreitenden Entwicklung genau zu beobachten.

Für besonders genaue Untersuchungen sind die Petrischalen besser durch sog. Soyka-Fläschchen zu ersetzen, bei denen Fremdinfektionen fast vollkommen ausgeschlossen sind. Das Substrat wird zunächst wie in Reagenzgläsern sterilisiert und geimpft; durch Flachlegen erhält man die „Platten".

Digitized by Google

Eventuell kann man auch durch Auftragen einer geringen Bakterienmenge auf die Mitte der steril erstarrten Scheibe Riesenkolonien entstehen lassen, die sehr charakteristische Bilder liefern (Abb. 23).

29. Strichkulturen. Mit der Platinöse wird aus den Bouillonröhrchen auf schräg erstarrtes Agar und auf Kartoffel übergeimpft, indem mit der flach aufgelegten Öse über die ganze Fläche hin (beim Agar im Kondenswasser beginnend!) ein gerader Strich gezogen wird. Das Agar darf dabei nicht verletzt werden. Bei der Kartoffel empfiehlt es sich, das Material nicht bloß aufzustreichen, sondern einzureiben. Auf Agar pflegt die Entwicklung (besonders wenn die frisch isolierten Kulturen bei 38° C. gehalten werden) sehr lebhaft zu sein; meist ist schon nach einem Tage eine ausgebreitete Auflage sichtbar. Farbe, Glanz, Konsistenz, Beschaffenheit der Oberfläche und des Randes, Geruch usw. sind von Tag zu Tag an den in die Reagenzglas-Gestelle plazierten Kulturen zu prüfen. In älteren Agarkulturen sind Kristallbildungen verschiedener Art ($MgNH_4PO_4$ u. a.) nicht selten.

Abb. 23. Soyka-Fläschchen mit Riesenkolonie von Azotobacter. ca. $^2/_3$ natürl. Größe.

Gelatine pflegt man nur selten zu Strichkulturen zu verwenden, da sie von sehr vielen Bakterien verflüssigt wird. Dagegen sind bisher nur einige wenige Arten bekannt, die Agar zur Auflösung

Digitized by Google

bringen (vergl. Gran, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., 9, S. 562 und Biernacki, ebenda, 29, S. 166).

30. Stichkulturen. Von einer jungen Agar-Strichkultur entnimmt man mit der Platinnadel eine geringe Menge Material und sticht dieses in die Gelatine und in das Traubenzucker-Agar ein (Abb. 24). Der Stich muß genau in der Mitte in gerader Richtung bis zum Boden des Glases geführt werden; seitliches Zerdrücken des Substrates ist zu vermeiden. Hart gewordene Gelatine, die hierbei leicht aufreißt, ist vorher zu verflüssigen und von neuem zum Erstarren zu bringen. Am Traubenzucker-Agar-Stich ist in erster Linie auf eintretende oder ausbleibende Gasentwicklung zu achten. An der Gelatine-Stichkultur ist die Entwicklung an der Oberfläche (sog. Auflage) und im Stich (Ausdehnung, Stärke, Aussehen) sowie die Art der etwaigen Gelatine-Verflüssigung genau zu beobachten und zu beschreiben (Abb. 25).

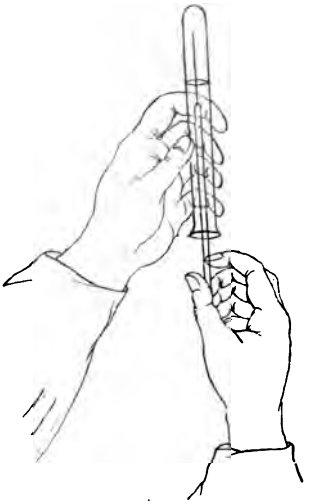


Abb. 24.
Anlegen der Stichkultur.

31. Flüssige Kulturen. Von der Bouillonkultur wird unter Benutzung der Platinöse in Milch übergeimpft. Diese bleibt entweder unverändert, oder sie wird verfärbt, durch Säure oder Lab koaguliert (Reaktionsprüfung!), aufgehellt (peptonisiert), oder es machen sich abnorme Änderungen des Geschmackes, des Geruches oder der Konsistenz (Schleim- oder Gasbildung) bemerklich. An den Bouillongläschen

Digitized by Google

ist festzustellen: Stärke und Art der Trübung, Haut- oder Ringbildung (an der Oberfläche), Auftreten von Bodensatz, Verfärbung, Geruch, Konsistenzänderungen usw.

Von diagnostischer Wichtigkeit ist mitunter der Nachweis von in der Bouillon gebildetem Indol. Dieses wird meist (nach Salkowski) in der Weise ermittelt, daß man die mindestens eine Woche alte Bouillon zuerst mit ca. 4 ccm 10-proz. Schwefelsäure, dann mit $^1/_2$—2 ccm $^1/_2$-promill. Natriumnitrit erwärmt (blaurote Färbung zeigt Indol an). Zuverlässiger ist indessen folgendes von Ehrlich angegebene Verfahren: Der Bouillonkultur werden zunächst 5 ccm

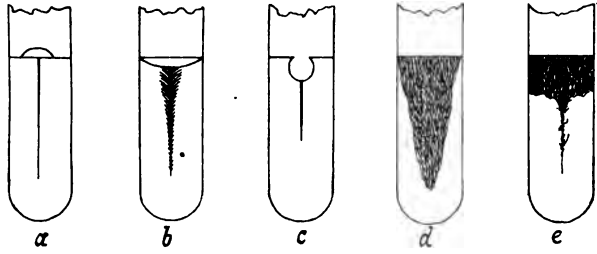


Abb. 25. Gelatine-Stichkulturen. $^1/_2$ natürl. Größe.
a) Nicht verflüssigende sog. Nagelkopf-Kultur. b) Schalenförmige Verflüssigung, Ästchenbildung im Stich. c) Kugelige Verflüssigung, geringe Entwicklung im Stich. d) Spitz-trichterförmige Verflüssigung. e) Zylindrische Verflüssigung.

einer salzsauren Dimethyl-amido-benzaldehyd-Lösung (4 g Paradimethyl-amido-benzaldehyd + 380 ccm 96-proz. Alkohol + 80 ccm konzentrierte Salzsäure), dann 5 ccm einer gesättigten wässerigen Kaliumpersulfat-Lösung hinzugefügt; Indol gibt intensive Rotfärbung. Die Lösungen werden gebrauchsfertig von Grübler & Co. in Leipzig geliefert. Vergl. A. Böhme, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig. 40, S. 129.

Auf etwa entweichenden Schwefelwasserstoff kann durch Einhängen eines Streifchens Papier + Bleiazetat (Schwarzfärbung) geprüft werden (vergl. auch § 132).

Digitized by Google

In allen Fällen ist jede Kultur mittels Etikette genau zu bezeichnen (Journal-Nummer, Substrat, Datum).

32. Prüfung verschiedener Kohlenstoff- und Stickstoffquellen. In den meisten Fällen gestattet die Prüfung auf den sechs Standard-Nährböden eine hinreichend sichere Erkennung der Art der untersuchten Bakterien. Mitunter erscheint es jedoch angezeigt, auch noch das Verhalten gegen andere Kohlenstoff- und Stickstoff-Quellen festzustellen. Über die ganz speziellen Ansprüche mancher Dünger- und Bodenorganismen wird weiterhin (Abschnitt C und D) zu sprechen sein. Zunächst handelt es sich nur um Versuche von allgemein-diagnostischer Bedeutung.

Abb. 26. Gasbildung in Zuckergelatine-Schüttelkultur.

Neben dem Traubenzucker können andere Zuckerarten (Laktose, Saccharose, Maltose, Galaktose usw.), Alkohole (Mannit, Glyzerin usw.), Fette, Salze organischer Säuren (Laktate, Malate, Succinate usw.) und andere C-Quellen berücksichtigt werden. Man setzt sie (gewöhnlich in Mengen von $^1/_2$ bis 2%) zuvor entzuckerter Bouillon zu.

Die Entzuckerung der Bouillon geschieht in der Weise, daß man Milchsäure-Streptokokken oder Coli-Bakterien einsäet, ein bis zwei Tage bei 30—38° C bebrütet, dann erhitzt, neutralisiert, filtriert und sterilisiert.

Lackmuszusatz gibt Auskunft über Säureproduktion.

Neben Bouillon kann auch (zuckerfreie) Gelatine Verwendung finden. Besonders instruktive Ergebnisse pflegen Schüttelkulturen zu liefern. Man erhält diese, indem man die Keime in der verflüssigten Gelatine gut verteilt und die Gelatine rasch erstarren läßt. Wird der betreffende Zucker vergoren, so werden zahlreiche Gasblasen in der Gelatine sichtbar (Abb. 26). Agar ist weniger

Digitized by Google

hierzu geeignet, weil darin beim Sterilisieren meist etwas Traubenzucker gebildet wird.

Zum Auffangen der Gärungsgase bedient man sich verhältnismäßig am häufigsten der Gärkölbchen nach Th. Smith (Abb. 27); das eventuell produzierte Gas sammelt sich (teilweise) in dem langen Schenkel und kann hier (bei entsprechender Graduierung) gemessen sowie qualitativ auf CO_2 und H geprüft werden. Die Apparate leiden daran, daß sie schwierig zu reinigen und leicht zerbrechlich sind. — Nach Burri und Düggeli (Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig. **49**, S. 155 ff.) kann man ein starkwandiges Glasrohr von 40—50 cm Länge erst mit 10 ccm geimpftem Zuckeragar beschicken und (nach dem Erstarren) eine Deckschicht von 60—80° warmem Wasseragar aufgießen; das Rohr wird horizontal im Brutschrank aufbewahrt, die Bewegung des „gleitenden Agarpfropfens" orientiert über die Intensität der Gasbildung. Kompendiösere, auch für genauere Gasanalysen geeignete Apparate konstruierten u. a. Epstein (Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **6**, S. 658), Hofstädter (ebenda, **13**, S. 765), Beijerinck und Minkman (ebenda, **25**, S. 32). Meist wird es jedoch genügen, nach vollständigem Füllen des Versuchsgefäßes einen (im Autoklav sterilisierten) durchbohrten, mit gebogenem Glasrohr versehenen Kautschukstopfen aufzusetzen und die Gärungsgase unter Wasser aufzufangen.

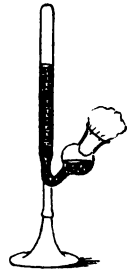


Abb. 27. Gärkölbchen nach Th. Smith. 1/3 natürl. Größe.

Zur Prüfung der im einzelnen Falle verwendbaren Stickstoffquellen können eventuell folgende Lösungen in Betracht kommen, die in bekannter Weise in Reagenzgläser portioniert und an drei aufeinander folgenden Tagen sterilisiert werden:

Peptonwasser: 100 Leitungswasser, 1 Pepton siccum Witte, 1 Kochsalz; nach dem Erhitzen zu filtrieren.

Cohnsche Nährlösung: 100 destill. Wasser, 1 weinsaures Ammon, 0,5 K_2HPO_4, 0,5 $MgSO_4(+ 7\ H_2O)$, 0,05 $Ca_3(PO_4)_2$; nicht filtriert.

Uschinskysche Nährlösung: 100 destill. Wasser, 3—4 Glyzerin, 0,6–0,7 Ammonlaktat, 0,3—0,4 asparaginsaures Natron, 0,5 bis 0,7 NaCl, 0,2—0,25 K_2HPO_4, 0,02—0,04 $MgSO_4$, 0,01 $CaCl_2$.

Digitized by Google

Fränkelsche Nährlösung: 100 destill. Wasser, 0,6 Ammonlaktat, 0,4 Asparagin, 0,5 NaCl, 0,2 K_2HPO_4; mit verdünnter NaOH deutlich alkalisch gemacht.

Maaßensche Nährlösung: 100 dest. Wasser, 0,7 Äpfelsäure, mit reinem KOH neutralisiert; dazu 1 Asparagin, 0,2 K_2HPO_4, 0,25 Na_2CO_3 kristallisiert, 0,04 $MgSO_4$, 0,001 $CaCl_2$ siccum. Eventuell werden 1,5—4% Zucker, Glyzerin, Mannit usw. hinzugefügt.

Vergl. ferner die von A. Meyer angegebenen Nährlösungen (s. Gottheil, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., 7, S. 432 und A. Meyer, Praktikum der botan. Bakterienkunde, 1903, S. 22 ff.) sowie die in den Abschnitten B bis D angeführten, speziellen Nährsubstrate.

VII. Heubakterien. Bakteriensporen.

33. Züchtung der Heubakterien. Einige Gramm fein zerschnittenes Heu werden im Becherglase mit Leitungswasser übergossen und mehrfach gründlich durchgerührt. Nach 1—2 Stunden filtriert man die Flüssigkeit durch ein Tuch ab, füllt ca. 100 ccm davon in einen 300 ccm-Erlenmeyer-Kolben und erhitzt („pasteurisiert") die Lösung $^1/_4$ Stunde im strömenden Dampf. Außerdem werden 10 ccm in einen 50 ccm-Erlenmeyer-Kolben gefüllt, und beide Kolben in den Brutschrank (38° C.) gestellt. Sobald Entwicklung eingetreten ist, wird mikroskopiert (Tuschepräparat und hängender Tropfen). In der nicht erhitzten Flüssigkeit finden sich allerhand Bakterien, Pilze und Protozoen, in der erhitzten nur große, bewegliche Stäbchen, die eventuell auch schon Sporen enthalten (runde, stark lichtbrechende Zelleinschlüsse, vergl. Taf. I, Abb. 4). Von der pasteurisierten Kultur sind Gelatine- und Agarplatten anzufertigen; die auftretenden Kolonien sind in den verschiedenen Stadien genau zu beschreiben. Nicht immer erhält man den Heubazillus i. e. S. (Bac. subtilis), oft treten statt dessen verwandte Formen auf, besonders der sog. Kartoffelbazillus (Bac. mesentericus). Eine oder zwei der sporenbildenden

Digitized by Google

Stämme sind nach erfolgter Reinigung auf die sechs Standard-Nährböden überzuimpfen.

34. Anfertigung von Agar-Gußkulturen. Für diejenigen, besonders unter den Sporenbildnern häufigen Formen, die besser bei 38° als bei 20° C. gedeihen, benutzt man für die Gußkulturen oft Agar statt Gelatine. Dabei ist die Schwerschmelzbarkeit des Agars sowie dessen rasches Erstarren bei 40° C. entsprechend zu berücksichtigen. Die nötige Zahl Agargläschen werden im Becherglas mit Wasser (im Dampf oder über der offenen Flamme) zum Schmelzen gebracht; durch Hinzufügen kalten Wassers erniedrigt man die Temperatur des Wassers auf 45° C. Durch eine untergestellte kleine Flamme wird die Temperatur konstant erhalten, nach 5—10 Minuten hat sich auch das Agar auf ca. 45° abgekühlt, so daß nun das Impfen in bekannter Weise (§ 21) vorgenommen werden kann, ohne daß die Bakterien durch allzu hohe Wärme leiden. Um andrerseits ein vorzeitiges Erstarren des Agars zu vermeiden, ist rasches Arbeiten unbedingt erforderlich. Augenblicklich nicht gebrauchte Gläser sind stets sofort wieder in das Wasserbad zurückzustellen; Verwechslungen kann durch Anbringen einer einfachen Marke am Wattestopfen (Drehen einer oder zwei Spitzen oder dergl.) vorgebeugt werden. Nach dem Ausgießen in die Schale ist das Agar schnell durch Hin- und Herneigen gut zu verteilen. Sobald die Platte fest geworden ist, wird die Schale umgekehrt, ein Stück abgeflammtes Filtrierpapier (ca. 4 qcm) in den Schalendeckel gelegt und ein Tropfen Glyzerin darauf gebracht. Auch im Thermostaten wird die Schale umgekehrt aufbewahrt. Man vermeidet so, daß sich das vom Agar ausgepreßte Wasser auf der Oberfläche ausbreitet; das Glyzerin fördert die Verdunstung. Während ohne besondere Vorsichtsmaßregeln ein Zusammenfließen der Kolonien auf Agar häufig

Digitized by Google

ist, erhält man unter Beachtung der angegebenen Regeln auch auf diesem Substrat gut isolierte Ansiedlungen.

35. Färbung nach Gram. Diese für diagnostische Zwecke mitunter wichtige Methode wird folgendermaßen ausgeführt:

1. Aus einer 1—2 Tage alten Bouillon- oder Agarkultur des Heubazillus wird in der üblichen Weise (§ 22) ein *Ausstrichpräparat* angefertigt und *fixiert.*

2. Man *färbt* zwei Minuten unter schwachem Erwärmen mit einer *Anilin-Viktoriablau-Lösung* folgender Zusammensetzung:

3—4 ccm konz. alkoh. Viktoriablau 5 Tropfen Anilinöl 15 ccm Alcohol absol. 30 ccm destill. Wasser	gemischt, nach 12- bis 24-stündiger Aufbewahrung gebrauchsfertig.

3. Nach Abgießen der Farblösung gibt man *Jod-Jodkalium* (sog. Lugolsche Lösung: 100 destill. Wasser, 1 JK, 0,3 J) auf das Präparat und läßt ebenfalls zwei Minuten (ohne Erwärmen) einwirken.

4. Nach Abgießen des Jod-Jodkaliums spült man mit *Alcohol absolutus*, bis kein Farbstoff mehr abgegeben wird.

5. Zuletzt wird, wie gewöhnlich, mit Wasser *abgespült, getrocknet* und in Kanadabalsam *eingeschlossen.*

Die Gramsche „Färbung" ist eigentlich eine „Entfärbung". Manche Bakterien geben bei der Behandlung mit Alkohol den Farbstoff an diesen ab, andre (z. B. der Heubazillus im jugendlichen Stadium) nicht. Aus alten Kulturen erhält man indessen auch bei sonst „grampositiven" Arten „gramnegative" Zellen, und manche Formen (z. B. die Knöllchenbakterien) zeigen noch größere Unregelmäßigkeiten.

Digitized by Google

Eine Agarstrichkultur des Heubazillus hält man sich zweckmäßig als Testmaterial für die Gramfärbung vorrätig. Bei der Prüfung andrer Arten kann man dann in Zweifelsfällen junge Heubazillen beimischen und deren färberisches Verhalten als Maßstab benutzen.

36. Bakteriensporen. 8—14 Tage alte Kulturen des Heubazillus (speziell von Heudekokt, Agar oder Kartoffeln) pflegen sehr reich an sporenhaltigen Stäbchen und an freien Sporen zu sein. Lebhafte Sporenbildung erhält man gewöhnlich auch dann, wenn man die in lebhafter Entwicklung begriffene Bakterienmasse (von Bouillon, Agar und dergl.) in sterilisiertes Leitungswasser überträgt.

Im hängenden Tropfen sind die fertig ausgebildeten Sporen besonders bei ziemlich weit geschlossener Blende als stark lichtbrechende Körner in der Regel sehr gut zu erkennen. In dem in gewöhnlicher Weise gefärbten Ausstrichpräparat erscheinen in der Entstehung begriffene Sporen (d. i. konzentriertes Eiweiß) als besonders intensiv gefärbte Teile des Bakterienleibes. Fertig ausgebildete Sporen bleiben dagegen im Innern ungefärbt und nehmen nur in der äußersten Schicht wenig Farbe auf. Wenn sie sich noch in den Stäbchen befinden, stellen sie sich als helle runde Stellen in den gefärbten Zellen dar.

Eine sichere Entscheidung darüber, ob es sich bei derartigen Erscheinungen wirklich um Sporen handelt, ist jedoch nach dem bloßen Anblick nicht zu fällen. Vakuolen, Fetttropfen u. a. können Sporen vortäuschen. Zur Gewinnung eines begründeten Urteils ist die Pasteurisierung, die Anwendung der Sporenfärbung und die Beobachtung der Sporenkeimung erforderlich.

Pasteurisierung. Von dem anscheinend sporenhaltigen Material werden 2—3 Ösen voll in ein Bouillonröhrchen übergeimpft und festgestellt, ob in diesem noch Entwicklung eintritt, wenn es zunächst eine Stunde bei ca. 80° C. gehalten wurde.

Digitized by Google

Das Bouillongläschen sowie ein ca. 10 ccm Wasser enthaltendes offenes Reagenzglas stellen wir in ein mit Wasser gefülltes Becherglas. In das Wasserröhrchen wird ein Thermometer eingelegt und durch eine untergestellte, nach Bedarf regulierte Flamme die Temperatur auf annähernd 80° C gehalten.

Ist genauere Auskunft über die Kochfestigkeit der betreffenden Sporen erwünscht, so stellt man eine größere Zahl reichlich mit sporenhaltigem Material geimpfte Bouillongläschen in das auf ca. 100° C erhitzte Wasserbad und nimmt in bestimmten Abständen (z. B. alle zwei oder fünf Minuten) je ein Glas heraus, das sofort in kaltem Wasser hinreichend abgekühlt wird.

Sporenfärbung. Es bestehen zahlreiche Vorschriften; z. B. kann man folgendermaßen verfahren:

1. Es wird in bekannter Weise ein *Ausstrichpräparat* angelegt, getrocknet und fixiert.

2. Man bedeckt die Bakterienschicht mit *Karbolfuchsin* (ein Teil konz. alkoh. Fuchsin + neun Teile 5-proz. wässerige Karbolsäure-Lösung).

3. Das Präparat wird 3—5 Minuten *erwärmt.* Der mit der Farblösung beschickte Objektträger wird bis zur beginnenden Dampfentwicklung über die (kleine!) Flamme gehalten, für kurze Zeit zur Seite gezogen, wieder über die Flamme gebracht und dies drei- bis fünfmal wiederholt.

4. Nach dem Abgießen der Farblösung spült man $^1/_2$ bis 1 Minute mit 3proz. *Salzsäure-Alkohol*, bis die rote Farbe fast verschwunden ist.

5. Es wird gründlich mit Wasser *abgespült*, mit wässerigem Methylenblau (20—30 Sekunden) *nachgefärbt*, *getrocknet* und in Balsam *eingeschlossen.*

Die Sporen müssen rot, die Stäbchen blau erscheinen. Nötigenfalls ist die Behandlung mit dem heißen Karbolfuchsin zu verlängern oder mit dem salzsauren Alkohol gründlicher zu entfärben. Besonders schwer färbbare Sporen werden zweckmäßig vor dem Färben $^1/_2$—2 Minuten mit 5-proz. Chromsäurelösung behandelt (mazeriert).

Digitized by Google

Sporenkeimung. In zweifelhaften Fällen gibt allein die direkte Beobachtung des Auskeimens einwandfreie Auskunft über die Sporennatur der fraglichen Gebilde. Derartige Prüfungen erfordern nicht selten große Ausdauer und gelangen deshalb nur in Ausnahmefällen zur Anwendung.

Aus einer viel Sporen enthaltenden Agarkultur bereitet man sich in einem Reagenzglas mit wenig Wasser eine stark getrübte Emulsion, die man 5—10 Minuten bei ca. 80° C hält. Man überträgt 2—3 Ösen des pasteurisierten Materiales auf ein in der Flamme sterilisiertes Deckglas, streicht aus und läßt antrocknen. Dann gibt man einen Tropfen flüssiges Nähragar auf und verfährt nach dem Erstarren des Tropfens und Abflammen des Objektträgers nach dem Prinzip des „hängenden Tropfens" (§ 25). Wegen der leichten Schmelzbarkeit der Vaseline ist zur Befestigung Kanadabalsam zu benutzen. Man legt das Präparat in den Brutschrank (38° C) und kontrolliert von Zeit zu Zeit (je $^1/_2$—1 Stunde), ob die Keimung beginnt. Ist sie einmal in Gang gekommen, so läßt sie sich in der Regel auch bei Zimmertemperatur unter dem Mikroskop gut verfolgen. Besonders für derartige Zwecke konstruierte Heizvorrichtungen sind relativ teuer.

VIII. Beschreibung und Bestimmung der Bakterien

37. Bakterienbeschreibung. Man gewöhne sich von vornherein an recht genaue und vollständige schriftliche Wiedergabe des Gesehenen. Einfache Zeichnungen können dabei oft sehr von Nutzen sein. Das auf S. 58 und 59 reproduzierte, stets zwei einander gegenüberliegende Seiten des Arbeitsjournals füllende Schema, hat sich wiederholt als nützlich erwiesen. Am Kopf der linken Seite wird die provisorische Benennung der betreffenden Kultur, rechts oben der wirkliche Artenname notiert, sobald dieser nach den Ergebnissen der Untersuchung feststeht. Die Kulturen sind in der Regel vier Wochen hindurch (bei genauen Prüfungen länger) zu kontrollieren.

Digitized by Google

W. 2 (grün).

Form und Größe: An den Enden abgerundete Stäbchen. Lebd. $^1/_2$—$^3/_4$ μ dick, $1\,^1/_2$ μ lang, oft zu zweien, auch längere Fäden. Gefärbt etwas dünner. Fäden 10 bis 15 μ lang.

Beweglichkeit: lebhaft.

Färbbarkeit: gut mit gewöhnl. Anilinfarben. Nicht nach Gram.

Sporenbildung: war nicht zu beobachten.

Fleischgelatineplatte: Oberflächenkol. makroskopisch: Rundl., undurchsichtige Häutchen, schalenförmige Verflüssigung. Verfl. Gelatine getrübt, Kolonie zerfällt krümelig. Gelatine grün gefärbt.

A

Oberflächenkol. mikroskopisch (50-fach): Junge Kol. rundlich, von unregelmäßiger Struktur, mit Haarkranz (Zeichnung A). — Ältere Kol. im Zentrum kompakt, nach außen hin krümelig zerfallend (Zeichnung B).

B

Tiefenkol. makroskopisch: meist weißgelbl. Pünktchen und Scheiben, z. T. bläulichweiße, unregelmäßig umrandete Häutchen.

Tiefenkol. mikroskopisch: Punktförmige Kol. gelbbraun, höckerig, unregelm. gekerbter Rand. Hautartige Kol. stark granulierte, hellgraue Schleier mit unregelm. zerfranstem Rand.

Digitized by Google

Bact. fluorescens (Flügge) Lehm. et Neum.

Fleischagar-Strich: Flacher, undurchsichtiger, grauweißer, glänzender Belag. Rand fein eingeschnitten, darum grauer, durchsichtiger, dünner Überzug auf dem Agar. Kondenswasser klar, weißl. Bodensatz. Agar stark grün fluoreszierend. Unangenehmer Geruch.

Traubenzucker-Agar-Stich: Ziemlich gute, fadenförmige Entwicklung im Stich. Auflage grauweiß, glänzend, ausgebreitet. Agar fluoresziert. Kein Gas.

Fleischgelatine-Stich: Gute Entwicklung im Stich, gelblich. Grauweißliche Auflage mit fein gebuchtetem Rand, sinkt schalenförmig ein. Verflüssigung später zylindrisch. Gelbgrüne Fluoreszenz.

Bouillon: Starke Trübung. Lockeres Häutchen. Grün fluoreszierend. Unangenehmer Geruch. Deutlich alkalisch. Kein Indol.

Milch: Langsam (in Schichten) aufgehellt. Von oben her grün verfärbt.

Kartoffel: Gelblich-graubrauner, mattglänzender, ausgedehnter Belag.

Bemerkungen: Glukose-Bouillon kein Gas, alkal. Reaktion. Saccharose-Bouillon ebenso, Laktose-Bouillon desgl.

Nitrat-Bouillon: Nitrat verschwindet ohne Gasbildung.

Digitized by Google

Form und Größe der Bakterien sind an Präparaten festzustellen, die mit Material von verschiedenen Substraten (meist Agar, Bouillon und Kartoffel) angefertigt wurden.

Von den festen Substraten ist stets nur wenig Material mit der Platinnadel zu entnehmen und in einem Wassertropfen sorgfältig zu verreiben. Um recht sauber gefärbte Ausstrichpräparate zu erhalten, ist es zuweilen angebracht, nach dem Abspülen ganz kurz mit sehr verdünnter Essigsäure (1 Eisessig : 200 Wasser) zu behandeln, nochmals abzuspülen und rasch zu trocknen. Anhaftende Nährbodenteile usw. werden dadurch beseitigt.

Von Milchkulturen geben Tuschepräparate oft recht gute Bilder (vergl. § 24). Soll gefärbt werden, so ist (zur Entfernung des Fettes) nach dem Antrocknen mit Alkohol und Äther vorzubehandeln; Alkohol fixiert gleichzeitig. Wegen einer speziellen Methode zur Gewinnung gut gefärbter Präparate aus geronnener Milch s. § 60.

Handelt es sich um eine anscheinend noch nicht in der Literatur beschriebene Art, so wiederhole man die Untersuchung mehrfach und dehne sie möglichst weit aus, um auch über die oft sehr bedeutende Variationsbreite genügende Auskunft zu erlangen.

Jedenfalls vermeide man es streng, auf Grund einiger weniger Beobachtungen die bereits außerordentlich große Zahl ungenügend beschriebener, angeblich neuer Arten weiter zu vermehren.

Vermag man in der Literatur keine Beschreibung aufzufinden, die sich mit den eigenen Beobachtungen vollständig deckt, so genügt es meist, mit wenigen Worten anzugeben, inwiefern der untersuchte Stamm von der an der betreffenden Stelle veröffentlichten Artbeschreibung abweicht.

Recht zweckmäßig ist unter Umständen die kurze Wiedergabe charakteristischer Merkmale unter Verwendung der von der „Gesellschaft amerikanischer Bakteriologen“ angenommenen, nachstehend reproduzierten Nummern-Bezeichnung.

Digitized by Google

100.	mit Sporen	.0001	Denitrifikation (N-Entbindung)
200.	ohne Sporen	.0002	Nitrate nicht reduziert
10.	obligat aërob	.0003	Nitratreduktion (ohne Gasbildung)
20.	fakultativ anaërob	.00001	fluoreszierend
30.	obligat anaërob	.00002	violett gefärbt
1.	Gelatine verflüssigt	.00003	blau „
2.	Gelatine nicht verflüssigt	.00004	grün „
.1	Säure und Gas aus Glukose	.00005	gelb „
.2	Säure, kein Gas aus Glukose	.00006	orange „
.3	Keine Säure aus Glukose	.00007	rot „
.4	Kein Wachstum mit Glukose	.00008	braun „
.01	Säure und Gas aus Laktose	.00009	rosa „
.02	Säure, kein Gas aus Laktose	.00000	nicht „
.03	Keine Säure aus Laktose		z. B. lauten die Zahlen bei
.04	Kein Wachstum mit Laktose		Bact. fluorescens: 221.33331
.001	Säure und Gas aus Saccharose		Streptoc. lactis: 222.22220
.002	Säure, kein Gas aus Saccharose		
.003	Keine Säure aus Saccharose		
.004	Kein Wachstum m. Saccharose		

38. Bakterienbestimmung. Die Identifizierung der isolierten Arten ist nicht immer leicht. Die im Anhang I beigefügten, tabellarischen Zusammenstellungen sind zur ersten Orientierung bestimmt. Näheres ist in den auf S. 2 angegebenen Werken über allgemein-bakteriologische und über speziell agrikulturbakteriologische Diagnostik nachzulesen.

Sammelwerke, in denen (wie bei Migula und Matzuschita) alle die oft höchst ungenauen, sog. Artbeschreibungen kritiklos aneinander gereiht wurden, sind für den Anfänger so gut wie unbrauchbar. Als sehr wertvoll hat sich dagegen fast in allen Fällen der „Atlas und Grundriß" von Lehmann und Neumann erwiesen. Zwar sind darin die medizinisch wichtigen Bakterien an erster Stelle berücksichtigt, doch läßt das Werk auch bei agrikulturbakteriologischen Untersuchungen nur selten im Stich. Der im Anhange I beigefügte Bestimmungsschlüssel ist in Anlehnung an die be-

Digitized by Google

treffenden Zusammenstellungen der genannten Autoren unter Berücksichtigung der für unsere Zwecke notwendigen Kürzungen und Erweiterungen entworfen worden. Die bei Lehmann und Neumann fehlenden Beschreibungen einiger landwirtschaftlich besonders wichtigen Bakterien müssen in den Originalarbeiten nachgelesen werden, die sich in meinem „Handbuch der landwirtschaftlichen Bakteriologie" zitiert finden. Vergl. außerdem die weiterhin in verschiedenen Kapiteln der Abschnitte B bis D folgenden speziellen Angaben.

39. Fortzüchtung der Reinkulturen. Nur bei regelmäßig und häufig (nach wenigen Tagen) wiederholten Überimpfungen gelingt es mit einiger Sicherheit, eine Form in ihren Eigenschaften konstant und lebenskräftig zu erhalten. Sporenbildende Arten verlieren das Sporulationsvermögen nicht selten, wenn nicht von Zeit zu Zeit eine entsprechende Auslese durch Pasteurisieren vorgenommen wird. Die isolierten Stämme sind für spätere Versuche in Agar-Strichkulturen vorrätig zu halten.

Kulturen neuer Arten werden zweckmäßig der bakteriologischen Sammlung von Král in Prag überwiesen. Ebendaher ist Vergleichsmaterial zu beziehen.

IX. Kartoffelbakterien. Anaërobentechnik

40. Züchtung der Kartoffelbakterien. Eine nicht gewaschene Kartoffel wird von mehreren Seiten mit dem Messer angestochen und in ein mit Wasser gefülltes Becherglas gelegt, das man mit einer Glasschale bedeckt in den Brutschrank (38° C) stellt. Nach 1—2 Tagen liefert der hängende Tropfen ebenso wie die Färbung nach Gram ein sehr interessantes und wechselvolles Bild. Aërobe Züchtung ergibt u. a. verschiedene Formen aus der Gruppe des „Kartoffelbazillus" (Bac. mesentericus). Bei Luftabschluß kommen dagegen besonders Buttersäurebazillen (Bac. amylobacter)

Digitized by Google

zur Entwicklung, die bei der Sporenbildung oft keulenförmig anschwellen (sog. Clostridium-Formen).

41. Isolierung obligat anaërober Bakterien. Zwei Burrische Röhren werden nach gründlicher Reinigung (an dem einen Ende mit Kautschukstopfen, am andern mit Watte verschlossen) im Autoklaven (2 Atm.) oder im Dampftopf (2 Std.) sterilisiert. Drei Fleischagar- und drei Traubenzucker - Agar - Gläschen werden zum Schmelzen gebracht, auf 45° abgekühlt und mit der Faulflüssigkeit (zuerst mit der Nadel, bei den weiteren Verdünnungen mit der Öse) in der üblichen Weise geimpft. In die senkrecht (Gummistopfen nach unten) auf die Tischplatte aufgesetzte Röhre wird jedesmal zuerst die dritte (schwächste) Verdünnung entleert; durch Einsetzen in kaltes Wasser bringt man sie rasch zum Erstarren. Dann folgt die zweite und, nachdem diese festgeworden ist, die erste Verdünnung. Beide Burri-

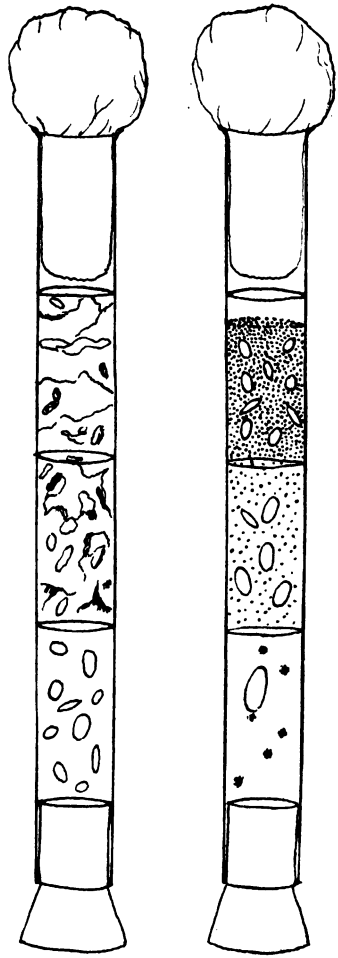


Abb. 28. Anaëroben-Isolierung in Burri-Röhren. 3/4 natürl. Größe. Rechts: Fleischagar, links: Traubenzucker-Agar.

Digitized by Google

Röhren werden im Brutschrank bei 38° C aufbewahrt. Nach ein bis zwei Tagen pflegt sich das in Abb. 28 reproduzierte Bild zu ergeben: im Traubenzucker-Agar sehr starke, im Fleischagar keine oder schwache Gasbildung. Deutlich erkennbare Kolonien sind infolgedessen gewöhnlich nur in diesem vorhanden.

Beim Abimpfen verfährt man folgendermaßen: Auf einen Porzellanteller legt man ein Stück Filtrierpapier, zieht den Kautschuckstopfen aus der Röhre und läßt aus dem schräg gehaltenen Glase vorsichtig den mit gut isoliert liegenden Kolonien besetzten Teil des Agars auf das Papier herausgleiten. Dann wird die Klinge eines (alten) Taschenmessers sowie ein Objektträger in der Flamme sterilisiert (abgeflammt, nicht geglüht) und mit dem Messer die Agarrolle in Scheiben zerschnitten, die man nacheinander flach auf den Objektträger auflegt. Vor jedem neuen Schnitt ist das Messer von neuem zu erhitzen. Man betrachtet nun, wie bei den Plattenkulturen, die Kolonien unter dem Mikroskop; etwaigen Luftinfektionen kann durch Auflegen abgeflammter Deckgläser auf die Agarscheiben vorgebeugt werden. Eine gut isoliert liegende Kolonie wird dann in gewohnter Weise in Bouillon abgeimpft und (nach § 42) unter anaëroben Verschluß gebracht. Nachdem (bei 38° C) genügende Entwicklung eingetreten ist, wird das Isolierungsverfahren mit Fleischagar nochmals wiederholt.

42. Reagenzglas-Kulturen obligat anaërober Bakterien. Im Prinzip wird in ganz derselben Weise wie bei der Prüfung aërober Arten verfahren. Nur verwendet man zweckmäßig starkwandige Gläschen. Diese beschickt man (nach gründlicher Reinigung) mit den benötigten Nährböden und sterilisiert noch ein- bis zweimal unter Watteverschluß. Man benutzt in diesem Falle nicht, wie sonst, entfettete, sondern fetthaltige Watte, aus der man feste,

Digitized by Google

aber nicht weit aus dem Glase hervorragende Stopfen anfertigt. Gleichzeitig stellt man sich 25 ccm einer 20-proz. Pyrogallussäure-Lösung und ebensoviel einer 20-proz. Kalilauge zurecht.

Der anaërobe Verschluß der geimpften Gläschen wird (nach Wright-Burri, Abb. 29) folgendermaßen bewirkt. Nach erfolgter Impfung des Gläschens schiebt man den darauf befindlichen Wattestopfen (mit Hilfe des Glasstabes) bis auf etwa 1 cm Abstand an das Substrat heran. Darüber setzt man einen mäßig lockeren (nicht sterilen) Stopfen aus entfetteter Watte, der etwa 2 cm unterhalb des Glasrandes abschneidet. Auf diesen läßt man zunächst 2 ccm der Pyrogallussäurelösung, danach 2 ccm der Kalilauge aufließen und verschließt rasch mit einem gut passenden Gummistopfen, den man nötigenfalls noch mit Paraffin abdichten kann.

Der schrägen Agarfläche gibt man in diesem Falle zweckmäßig eine etwas geringere Ausdehnung als gewöhnlich. Im übrigen macht dieses sehr handliche Verfahren alle die zahllosen Komplikationen überflüssig, die für die Anaërobenzüchtung sonst angegeben wurden. Will man überimpfen, so wird zunächst der Gummistopfen entfernt, dann die mit Pyrogallol getränkte Watte (unter Benutzung einer kräftigen Pinzette, drehend) herausgezogen und beseitigt, schließlich der sterile Wattestopfen in seine ursprüngliche Lage ge-

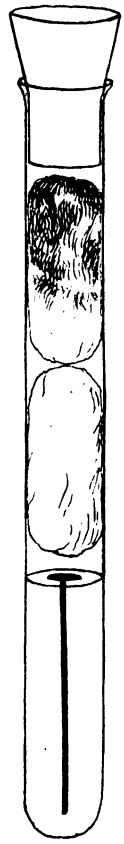


Abb. 29. Kulturglas mit Anaëroben-Verschluß n. Wright-Burri. $^2/_3$ nat. Gr.

Digitized by Google

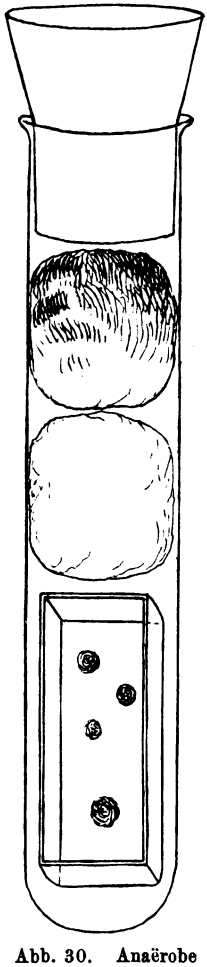


Abb. 30. Anaërobe Plattenkultur n. Burri. $^2/_3$ natürl. Größe.

bracht. Bei einiger Vorsicht ist es vollkommen ausgeschlossen, daß die Kultur mit Pyrogallol verunreinigt wird.

43. Plattenkulturen anaërober Bakterien. Man sterilisiert in Petrischalen kleine, rechteckige Glaströge und gießt in diese, statt wie sonst in die Schale, die infizierte Gelatine. Nach dem Erstarren des Substrats und nach gründlicher Sterilisierung der Hände (Reinigen mit Seife, mehrere Minuten Eintauchen in $1\,^0/_{00}$ Sublimatlösung) bringt man die Glaströge in weite Reagenzgläser, die man nach Wright-Burri verschließt (Abb. 30). Nach eingetretener Entwicklung werden die Tröge zwecks eingehender Untersuchung wieder in sterilisierte Petrischalen eingestellt.

Neben diesem von Burri ersonnenen Verfahren scheint auch eine von Heim neuerdings angegebene Methode recht praktisch zu sein. Die Gußkulturen werden hier wie gewöhnlich in Petrischalen angelegt, auf runde Glasscheiben von 13 cm Durchmesser wird ein dem Umfang der unteren Schalenhälfte entsprechender Plastilin-Ring aufgelegt und in die Mitte hiervon ein Wattebausch (von ca. 0,5 g Schwere). Diesen tränkt man zunächst mit 2 ccm Pyrogallol-Lösung, hält dann die umgekehrte, die Gußkultur enthaltende Schalenhälfte

Digitized by Google

darüber, fügt 2 ccm Kalilauge hinzu und sorgt durch rasches Eindrücken des Schalenrandes in das Plastilin sowie durch sorgfältiges Verstreichen für völligen Luftabschluß.

Literatur: Wright, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., **29**, S. 61; Burri, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., 8, S. 533; Kürsteiner, ebenda, **19**, S. 1, 97, 202, 385, spez. S. 21 ff. und 97 ff.; Heim, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., **55**, S. 337. Wegen der anderen Methoden vergl. die betreffenden Kapitel in den Lehrbüchern über allgemeinbakteriologische Technik.

X. Spezielle Methoden[1])

44. Auxanographie. Zwecks Feststellung der von den verschiedenen Mikroorganismen benötigten oder bevorzugten Nährstoffe kann man sich der von Beijerinck angegebenen „auxanographischen" Methode bedienen. Unter Verwendung von Wasser oder rein mineralischer Lösung hergestellte Gelatine (bezw. Agar) wird reichlich mit den betreffenden Keimen geimpft und in Petrischalen ausgegossen. Nach dem Erstarren (bei Agar nach hinreichendem Trockenwerden) der Platte trägt man keimfreie Tröpfchen der zu prüfenden Nährstoffe auf; diese diffundieren in das Substrat und mischen sich hier in verschiedener Weise. Überall da, wo eine zusagende Kombination zustande kam, entwickeln sich die Keime und man kann aus dem sich so ergebenden „Auxanogramm" (d. h. Vermehrungsbild) die entsprechenden Schlüsse ziehen.

Literatur: Beijerinck, Centralbl. f. Bakt., 7, 1890, S. 347.

45. Prüfung auf Symbiose resp. Antagonismus. Zuweilen erscheint es angezeigt, festzustellen, ob mehrere bestimmte Arten aufeinander günstig oder nachteilig einwirken können. Dies kann zunächst in der Weise geprüft werden, daß man (ähnlich wie bei

[1]) Die in §§ 44—48 enthaltenen Angaben sollen zur Orientierung über einige Methoden dienen, die sowohl von allgemeinem Interesse wie im Hinblick auf gewisse Untersuchungen spezieller Art (aus dem Gebiete der Molkerei-, Dünger- und Bodenbakteriologie) von Wichtigkeit sind.

Digitized by Google

der auxanographischen Methode) ein geeignetes Substrat reichlich mit einer Bakterienart impft und nach dem Festwerden der Platte parallele oder einander kreuzende Strichkulturen der anderen Keime darauf anlegt. Ferner kann man aber auch verschieden zusammengesetzte Lösungen mit annähernd gleichen Mengen der zu prüfenden Spezies impfen und zusehen, ob eine gegenseitige Förderung oder Hemmung wahrzunehmen ist.

46. Anhäufungsversuche. Auf dem soeben erwähnten Prinzip beruhen die besonders von Prof. Beijerinck in Delft mit großem Erfolge benutzten, meist sehr instruktiven Anhäufungsversuche. Die differente chemische Zusammensetzung der Substrate kann in Verbindung mit den jeweils innegehaltenen physikalischen Versuchsbedingungen (Luftzutritt, Temperatur usw.) in vorzüglicher Weise dazu dienen, die an einer bestimmten Umsetzung beteiligten Arten aus einem komplizierten Mikrobengemisch auszulesen und anzureichern. Besonders für die Dünger- und Bodenbakteriologie (vergl. Abschnitt C und D) sind derartige Methoden von hervorragender Wichtigkeit. Auch bei den spontanen „Gärungen" (Einsäuerung von Futtermitteln, Säuerung der Milch, Käsereifung usw.) wie bei den durch Bakterien erregten Krankheitserscheinungen handelt es sich sehr oft um „natürliche Anhäufungen" der aktiven Arten. Im Experiment kann jedoch durch Innehalten bestimmter Versuchsbedingungen der Einfluß des „Zufälligen" in viel höherem Maße eliminiert werden. Im „vollkommenen" Anhäufungsversuch bleibt schließlich nur eine Art übrig und zwar erhält man, was in systematischer Hinsicht von großer Bedeutung ist, alle möglichen Varietäten dieser Art, die man oft irrtümlicherweise für besondere Spezies halten könnte, wenn sie getrennt aufgefunden und untersucht worden wären. In der Tat sind viele angeblich verschiedene Bakterienarten nur unvollständig untersuchte Varietäten einiger weniger Spezies. Dieser Überproduktion an „neuen Arten" kann mit Hilfe der auf den Anhäufungsversuch basierten Mikroben-Diagnose erfolgreich entgegengearbeitet werden.

47. Verdünnungsmethode. Die im Anhäufungsversuch erprobten Lösungen können dazu dienen, den numerischen Keimgehalt

Digitized by Google

verschiedener physiologischer Gruppen im Dünger, Boden usw. zu ermitteln. Viele landwirtschaftlich besonders wichtige Bakterien wachsen nicht oder nur sehr kümmerlich auf den sonst gebrauchten Substraten. Namentlich lassen die festen Nährböden oft nur wenige der vorhandenen Keime zur Entwicklung kommen. Man kann statt dessen geeignete Nährlösungen unter Verwendung von mindestens vier Parallelreihen mit Verdünnungen impfen, die, wie gewöhnlich, in Wasser hergestellt wurden. Die in die ersten Gläser bei der Impfung eingeführten Mengen an Erde, Dünger, Milch oder dergl. müssen (zwecks Erzielung möglichst gleichartiger Versuchsbedingungen) den anderen Versuchsgefäßen in sterilisiertem Zustande zugesetzt werden. Durch Umrechnung ergibt sich dann annähernd die Zahl der in 1 g Substanz vorhandenen Erreger der betreffenden Umsetzung (z. B. Salpeterbildner). Allerdings muß man dabei von der oft nicht zutreffenden Voraussetzung ausgehen, daß in die letzten Gläser, in denen noch Entwicklung eintrat, nur ein Keim gelangte.

48. Ein-Zell-Kultur. Wenn auch gegenüber der älteren Verdünnungsmethode in Flüssigkeiten die Gußkultur-Methode (nach R. Koch) entschieden größere Gewähr dafür bietet, daß tatsächlich aus einem Keim entstandene Reinkulturen zur Untersuchung gelangen, so fehlt es doch auch hier noch an der oft wünschenswerten absoluten Sicherheit. Nur mit Hilfe einer wirklichen Ein-Zell-Kultur kann dieses Ziel erreicht werden, das für die Züchtung der relativ großen Sproßpilze schon vor längerer Zeit durch die Forschungen von E. Chr. Hansen zugänglich gemacht wurde. Für die Bakterien fehlte es dagegen bis vor kurzem an einer geeigneten Methode, die aber jetzt in der von R. Burri ausgearbeiteten *Tuschepunkt-Kultur* gegeben ist. Unter Verwendung einer sterilisierten, hinreichend verdünnten Tusche-Aufschwemmung (von Grübler & Co. in Leipzig) werden auf einen sauberen, abgeflammten Objektträger mit Hilfe einer großen Platinöse drei bis vier Tuschetropfen aufgetragen und in diesen das keimhaltige Material in der üblichen Weise (zuerst mit der Nadel, weiterhin mit der Öse) fortlaufend verdünnt. Mit Hilfe einer vorher durch die Flamme gezogenen Zeichenfeder überträgt man aus den schwächsten Verdünnungen kleinste (etwa 0,1 mm große) Tröpfchen auf eine sterile Gelatine-

Digitized by Google

platte. Eine Anzahl Petrischalen mit keimfreier Gelatine sind in Vorrat zu halten; die Feder ist in möglichst horizontaler Lage der Gelatine leicht zu nähern (nicht aber in diese einzustechen!). Die in Reihen angeordneten Tröpfchen werden mit vorher sterilisierten kleinen Deckglasstücken (ca. 3 × 3 mm) bedeckt und mit einem starken Trockensystem untersucht. Die nur einen Keim enthaltenden Tröpfchen läßt man entweder an Ort und Stelle zu einer Kolonie auswachsen, oder man überträgt das mit sterilisierter Pinzette gefaßte Deckglas nebst dem anhaftenden Keim in ein geeignetes Substrat. Diese Übertragung gelingt, weil der Keim besser am trockenen Deckglas als an der feuchten Gelatine haften bleibt.

Literatur: Burri, Das Tuscheverfahren, 1909, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **20**, S. 95.

Digitized by Google

B. Molkerei-Bakteriologie

XI. Keimgehalt der Milch. Schleuderproben

49. Nährböden. Der Bestand an verfügbaren Reagenzgläsern ist auf 250 Stück zu ergänzen; zwei Liter möglichst sauber gewonnene frische Magermilch und 3—4 Kartoffeln sind zu beschaffen. Nach der in §§ 6—13 geschilderten Arbeitsweise werden zunächst fertiggestellt:

30 Glas Fleischgelatine	15 Glas Bouillon
30 Glas Fleischagar	30 Glas Milch
15 Glas Traubenzucker-Agar	15 Glas Kartoffeln

Von der übrigbleibenden Bouillon werden 120 ccm mit 0,5 % Milchzucker, der Rest mit 0,5 % Aesculin und 0,5 % Ferrizitrat versetzt, so daß noch 15 Gläschen *Milchzucker-Bouillon* und ca. 10 Gläschen *Aesculin-Bouillon* (für die Coliprobe, § 58) resultieren.

Weiter bereiten wir uns *Molkengelatine* und *Molkenagar* nach folgendem Rezept: Die noch vorhandenen $1^3/_4$ Liter Magermilch werden bei 35° C mit Lab dick gelegt. Das Koagulum wird mit einem Glasstab grob zerkleinert und das Gemisch im Wasserbad bis auf etwa 80° C. erhitzt. Die Molke wird durch ein Tuch abgeseiht, mit 1 % Pepton sicc. Witte und $^1/_2$ % Kochsalz versetzt, eine Stunde lang im Dampftopf erwärmt und durch Papier filtriert. Vom Filtrat werden je 250 ccm (in analoger Weise wie Bouillon) zu Molkengelatine und Molkenagar (je 30 Gläschen) verarbeitet; der Rest wird im 2-Literkolben sterilisiert und

Digitized by Google

für später reserviert. Molken-Nährböden sind entweder gar nicht oder doch jedenfalls nur sehr schonend (bis $^1/_2$ Atm.) im Autoklaven zu erhitzen.

Der angegebene Vorrat an Nährsubstraten reicht ungefähr für die in Kapitel XI—XVIII angegebenen Übungen, sofern nicht besonders ausführliche Untersuchungen damit verbunden werden.

Andere eventuell zu berücksichtigende Nährböden sind: *Heyden-Agar* (100 destill. Wasser, 1 Nährstoff Heyden, 1 Agar), *Fleischpepton-Molkengelatine* (enthält Bouillon und Molken zu gleichen Teilen), *Laktose-Gelatine* und *Laktose-Agar* (Fleischgelatine und -agar mit 2% Laktose) eventuell mit Zusatz von *Lackmus* zur Erkennung der Säurebildner; vergl. hierzu den empfehlenswerteren Kreidezusatz § 60.

50. Keimgehalt der Milch. Zur Herstellung der nötigen Verdünnungen (vergl. § 20) sind ein 300-ccm-Erlenmeyerkolben mit 100 ccm und 10 Reagenzgläser mit je 9 ccm Leitungswasser, 10 1-ccm-Pipetten sowie 24 Petrischalen zu sterilisieren. Da je nach der Beschaffenheit der Mikroflora in den verschiedenen Milchproben bald das eine, bald das andere Substrat günstigere Resultate liefert, sind von Fleischgelatine, Fleischagar, Molkengelatine und Molkenagar je 6 Gläser zurechtzustellen. Von einer (vermutlich) relativ keimarmen Milchprobe sind 3 Verdünnungen derart anzulegen, daß die betreffenden Petrischalen mit $^1/_{10}$, $^1/_{100}$ und $^1/_{1000}$ ccm Milch beschickt werden, während von gewöhnlicher Marktmilch, von der zunächst 1 ccm in den im Erlenmeyerkolben befindlichen 100 ccm verteilt wird, zweckmäßig $^1/_{10\,000}$, $^1/_{100\,000}$ und $^1/_{1\,000\,000}$ ccm Verwendung finden. Da die Keime in der Milch oft zu mehreren aneinanderhängen, muß bei Anfertigung der Verdünnungen stets kräftig geschüttelt werden. Zentrifugieren ruft aus dem gleichen Grunde meist eine sehr bedeutende (scheinbare) Erhöhung der Keimzahl hervor.

Digitized by Google

Die Gelatine-Gußkulturen werden 8—10 Tage bei 20°, die Agar-Platten (umgekehrt, mit Glyzerin-Papier im Deckel!) 3 Tage bei 38° C. gehalten (vergl. §§ 17 und 34), ausgezählt und einer eingehenden Durchmusterung unterworfen. Die am häufigsten auftretenden Formen sind abzuimpfen, durch erneutes Plattengießen (nach § 21) zu reinigen und in bekannter Weise (s. Kap. V—VIII) zu untersuchen.

Zur Erledigung der vorstehend angegebenen Keimzahlbestimmungen können sich zweckmäßig zwei bis vier Praktikanten vereinigen. Wenn möglich, sind mit den betreffenden Milchproben (je $^1/_2$ Liter) noch am gleichen Tage die in §§ 51—56 besprochenen Versuche vorzunehmen bezw. in Gang zu bringen. Die hergestellten Verdünnungen sind eventuell sogleich zum Ansetzen der Coliproben (§ 58) zu verwenden. Bei genauen Untersuchungen sind Parallelversuche selbstverständlich unentbehrlich.

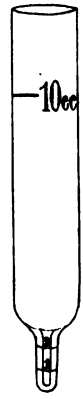


Abb. 31. Schleudergläschen n. Trommsdorff. $^1/_2$ nat. Gr.

51. Schleuderproben. Für viele Zwecke genügt es, die umständlichen und doch unzulänglichen Keimzählungen auf der Platte durch die mikroskopische Betrachtung des Zentrifugen-Sedimentes zu ersetzen. Besonders bei Prüfung fehlerhafter Milch erweist sich die Methode oft recht nützlich. Je 10 ccm der gut durchmischten, auf 60—70° C erwärmten Milch werden in kleine, unten verengte Gläschen (Abb. 31) gefüllt und in einer einfachen Zentrifuge, etwa nach Art der in Abb. 32 dargestellten, ca. fünf Minuten lang so rasch zentrifugiert, daß ein mehr oder minder reichlicher

Abb. 32. Zentrifuge. $^1/_6$ natürl. Größe.

Digitized by Google

kompakter Bodensatz niedergeschlagen wird, der beim Ausgießen der Milch fest im verengten Teil des Glases haften bleibt. Nötigenfalls ist das Zentrifugieren zu wiederholen. Schmutzige Milch gibt ein grau- bis braungefärbtes Sediment, der Säuerung nahestehende einen weißen Absatz (von Kasein); zuweilen aber wird auch ein reichlicher, rahmgelber Niederschlag ausgeschieden, besonders dann, wenn es sich um die Milch euterkranker Tiere handelt.

Nach Beseitigung der Milch wird ein wenig von dem Sediment zu einem (am besten mit wässerigem Methylen-

Abb. 33. Mikroskopisches Bild des Schleuder-Rückstandes a) von keimarmer Milch, b) von gewöhnlicher, an Milchsäure-Streptokokken reicher Marktmilch, c) von verschmutzter Marktmilch mit viel Stäbchen-Konglomeraten, d) von Mastitis-Milch mit viel Leukozyten und Mastitis-Streptokokken. Vergr. 700-fach.

blau) gefärbten Ausstrichpräparat verarbeitet. Einige besonders charakteristische Bilder sind in Abb. 33 wiedergegeben. Das gleichzeitige Vorkommen von viel Leukozyten (sog. Eiterkörperchen) und Streptokokken (mit kreisrunden oder scheibenförmigen Einzelgliedern) steht fast ausnahmslos mit Mastitis (Euterentzündung) im Zusammenhange. Dagegen kann auch bei völlig gesunden Tieren zeitweise eine stark vermehrte Leukozyten-Abscheidung (viel rahmgelber Absatz im Gläschen, aber keine Streptokokken im Präparat) zur Beobachtung kommen, ohne daß die Gesundheit des Tieres zu Bedenken Veranlassung gäbe.

Digitized by Google

Zur Anhäufung wenig zahlreicher Mastitis-Streptokokken kann vom Sediment zunächst in gewöhnliche oder mit $^1/_2$—1 % Koffeïn versetzte Bouillon abgeimpft werden (Baruchello, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., **39**, S. 569 - 573).

Zwecks sicherer Erkennung von Mastitis-Milch benutzen L. Russell und Hastings (Experimental Dairy Bacteriology, 1909, S. 122) folgenden *Fibrin-Nachweis:* Das getrocknete Ausstrichpräparat wird fünf Minuten mit Anilin-Gentianaviolett (bereitet analog dem in § 35 erwähnten Anilin-Viktoriablau) gefärbt, dann zwei Minuten mit Lugolscher Lösung behandelt, mittels Anilinöl entfärbt, mit Wasser abgespült, getrocknet und eingeschlossen. Fibrin-Anwesenheit bedingt Vorhandensein dunkelpurpurfarbiger Fäden.

Literatur zu §§ 49 - 51: Die betr. Kapitel der auf S. 2 an vierter und sechster Stelle aufgeführten Lehr- und Handbücher, speziell Löhnis, Handbuch der landw. Bakteriologie, 1910, S. 153 bis 170, 175—179. Die wichtige Streptokokken-Leukozyten-Frage wurde sehr eingehend behandelt von W. Ernst, Monatshefte f. prakt. Tierheilkunde, **20**, 1909, S. 414 ff., **21**, 1909, S. 63 ff.

XII. Reduktase-, Katalase-, Koch- und Alkohol-Probe

52. Reduktase-Probe. Eine große Zahl von Farbstoffen (Methylenblau, Indigokarmin, Lackmus u. a.) kann sowohl durch Milchbestandteile wie namentlich durch Bakterien derart reduziert werden, daß farblose Substanzen entstehen. Mit Methylenblau gefärbte Milch entfärbt sich im allgemeinen umso rascher, je keimreicher sie ist. Allerdings ergeben sich Differenzen, insofern manche Bakterienarten stark, andere nur schwach reduzieren. Zu den letzteren gehören die Milchsäure-Bakterien, die aber in der Milch im allgemeinen nicht unerwünscht sind. Gute Milch zeigt demnach stets eine lange Reduktionszeit, schlechte eine kurze. In Schweden und Dänemark wird die Reduktase- (oder Reduktions-)Probe bereits in ausgedehntem Maße zur Be-

Digitized by Google

urteilung der Handelsmilch benutzt. Man ist hierbei zu folgenden vier Gruppen gelangt:

Reduktionszeit:	mehr als 6 St.	6—2 St.	2—¼ St.	weniger als ¼ St.
Qualität:	gut	mittel	schlecht	sehr schlecht

Es sind entsprechende Prüfungen (eventuell in Verbindung mit Keimzählungen nach § 50) auszuführen. Große Reagenzgläser (oder Gärgläser, s. § 55) werden mit je 40 ccm Milch gefüllt; diese wird vermischt mit 1 ccm verdünnter Methylenblau-Lösung (5 ccm konz. alkoh. Methylenblau und 195 ccm destill. Wasser) und im Wasserbade bei 38—40° C. aufbewahrt.

53. Katalase-Probe. Wie von fast allen Bestandteilen des tierischen und des pflanzlichen Organismus wird Wasserstoffsuperoxyd auch von der nicht erhitzten Milch und den meisten der darin enthaltenen Bakterien zersetzt. Neben einigen anderen, weniger wichtigen Arten, machen auch hier wieder die Milchsäurebakterien eine Ausnahme, insofern sie gar nicht oder nur wenig Sauerstoff abspalten. Sowohl in der Milch wie in den Bakterien tritt ein als „Katalase" bezeichnetes Enzym in Tätigkeit. Versetzt man 15 ccm Milch mit 5 ccm 1-proz. Wasserstoffsuperoxyd (erhalten durch Vermischen von 1 Teil Perhydrol von Merck in Darmstadt mit 29 Teilen destilliertem Wasser), so werden normalerweise innerhalb von 2 Stunden bei Zimmertemperatur (18—22° C.) nicht mehr als 2—3,5 ccm Sauerstoff entbunden.

Zum Auffangen des entweichenden Gases sind bereits eine ganze Reihe von Apparaten empfohlen worden, die aber sämtlich noch nicht voll befriedigen. Zwei relativ einfache, handliche und zuverlässige Einrichtungen sind in Abb. 34 und 35 dargestellt. Der Apparat nach Henkel wird komplett für 15—30 Proben von Wagner und Munz in München, Carlstr. 43, geliefert. Die in meinem Laboratorium benutzte Vorrichtung ist so konstruiert, daß sie, nachdem einmal das Wasserniveau im unteren Teile auf 0 ein-

Digitized by Google

gestellt ist, lange Zeit benutzt werden kann, ohne daß eine Korrigierung nötig wäre. Das mit Milch und H_2O_2 gefüllte Glas (M) wird eingeschoben, die beiden durchbohrten Gummistopfen werden aufgesetzt und der eine bei K mit einem kurzen Glasstab verschlossen. Will man nach Abschluß des Versuches die Wassersäule im graduierten Steigrohr fixieren, so schließt man in entsprechender Weise bei W.

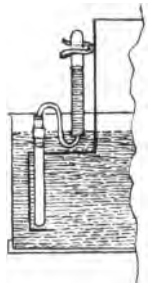


Abb. 34. Katalase-Apparat nach Henkel. 1/12 natürl. Gr.

Kolostrum- und Mastitis-Milch liefert oft 6—10 ccm und mehr. Desgleichen wächst die O-Abscheidung mit der Vermehrung der Milchkeime bei der Aufbewahrung. Durch Hitze sterilisierte Milch wirkt nicht katalytisch; etwa eintretende Wasserstoffsuperoxyd-Zersetzung zeigt an, daß das Sterilisieren nicht vollständig war. Entsprechende Prüfungen sind anzustellen.

Abb. 35. Katalase-Apparat nach Löhnis und Schröter. 1/4 natürl. Gr.

54. Koch- und Alkoholprobe. Beide Proben vermitteln ein ungefähres Urteil über den allgemeinen Zersetzungsgrad der Milch, während sich zum Säuregrad keine direkten Beziehungen ergeben. Zur Alkoholprobe ist neutraler 70-proz. Alkohol zu verwenden (2 ccm zu 2 ccm Milch, im Reagenzglas gemischt). Alkohol von 44% gibt ungefähr die gleichen Resultate wie die Kochprobe. Gute Milch hält, wenn sie bei Temperaturen unterhalb 12° C aufbewahrt wird, beide Proben 6 Tage und eventuell noch länger aus. Das entsprechende Verhalten der Milchproben, die zu den in §§ 50—53, sowie 55 und 56 besprochenen Versuchen dienten, ist festzustellen.

Digitized by Google

XIII. Milch- und Lab-Gärproben. Nachweis von Fremdinfektionen

55. Milch-Gärproben. 40 bis 60 ccm Milch werden in (vorher im Trockenschrank zu sterilisierende) große Reagenz- oder besondere Gärproben-Gläser gefüllt und 12 bis 24 Stunden im Wasserbad von 40° C (eventuell unter Verwendung des in Abb. 36 dargestellten oder eines ähnlichen „Gärapparates") aufbewahrt.

Die wichtigsten (der auf Tafel II. Abb. 1 z. T. wiedergegebenen) *Gärproben-Typen* sind folgende:

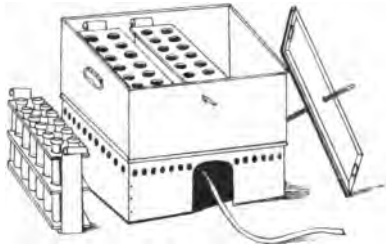


Abb. 36. Gärapparat. ca. $^1/_{20}$ nat. Größe.

1. Gute Milch bleibt unverändert.

2. Ein reiner Bestand an Milchsäure-Bakterien bedingt gleichmäßige, gallertige Gerinnung (ohne Molken-Abscheidung).

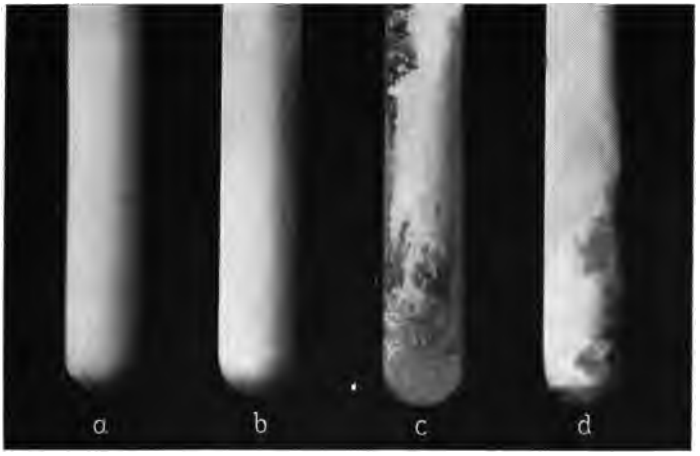
3. Griesige oder käsige Gerinnung wird durch labproduzierende Bakterien, z. T. in Gemeinschaft mit Säurebildnern hervorgerufen.

4. Je nach dem Gehalt an Kotbakterien (Coli, Aërogenes, Buttersäure-Bakterien) wird eine mehr oder minder starke Gasbildung (sog. „Blähung") bemerklich.

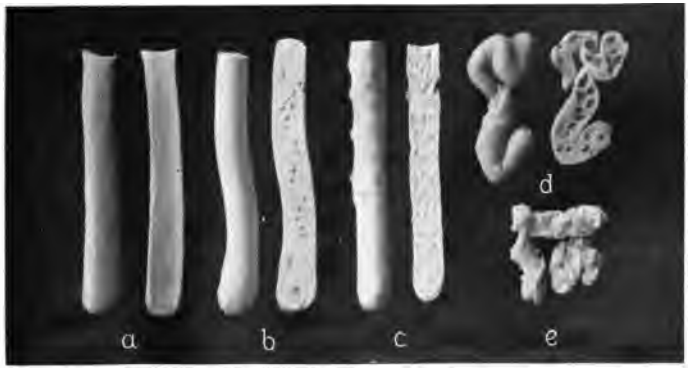
5. Bei beginnender Euterentzündung wird oft ein rahmgelber Bodensatz sichtbar (vergl. § 51).

Naturgemäß gibt es die verschiedenartigsten Misch- und Übergangs-Erscheinungen. Nach einiger Übung ist man jedoch bald in der Lage, auf Grund des Gärproben-Ausfalles ein meist recht zutreffendes Urteil über die Be-

Digitized by Google



1. *Milchgärproben* (§ 55).
a) gallertig, b) griesig, c) käsig, d) Blähung.



2. *Labgärproben* (§ 56). a) glatt, ohne Löcher (8), b) fast glatt, aber ziemlich viel Löcher (5), c) uneben, viel Löcher (3), d) unregelmäßig, schwammig (1), e) lose, zerrissen (0).

Digitized by Google

Digitized by Google

schaffenheit der betreffenden Milchprobe zu fällen. Geschmack und Geruch müssen selbstverständlich ebenfalls genau geprüft werden. Zu beachten ist, daß keimarme Milch nicht selten Blähungen gibt. Die Berücksichtigung der Reduktionsprobe (§ 52) schützt in solchen Fällen vor Trugschlüssen.

Die von O. Jensen empfohlene Kombination von Reduktions- und Gärprobe (in einem Glas) hat sich nicht sonderlich bewährt; der Farbenzusatz wirkt mitunter sehr störend auf den Ausfall der Gärprobe ein.

Der sehr schlechte Nachgeschmack, den die Gärproben-Milch oft hinterläßt, wird durch Perhydrol-Mundwasser rasch zerstört. Spülungen hiermit verhüten auch etwaige Infektionen durch zufällig anwesende pathogene Keime.

56. Lab-Gärproben. Wird die Milch vor dem Einsetzen in das Wasserbad mit einer passenden Menge Lab versetzt (z. B. pro Glas 2 ccm einer Auflösung von 1 Hansenschen Labtablette in 500 ccm Wasser), so erhält man nach 12 Stunden bei 40° C ein mehr oder minder gut ausgebildetes Käschen, das sowohl nach seinem Äußeren wie nach der Beschaffenheit auf dem Durchschnitt (speziell: Lochbildung) ebenfalls wichtige Schlüsse zu ziehen gestattet, die das Milch-Gärproben-Ergebnis in erwünschter Weise ergänzen. Abb. 2 auf Tafel II gibt die markantesten Lab-Gärproben-Bilder wieder.

Die in Klammern beigefügten Zahlen entsprechen der Punkt-Bewertung, wie sie auf den Frischmilch-Wettbewerben der „Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft" üblich ist. Milch- und Labgärproben liefern bei diesen Konkurrenzen im Verein mit Koch- und Alkoholprobe die wichtigsten Grundlagen zur Urteilsbildung.

Literatur: Herz, Jahrb. d. Deutsch. Landw.-Gesellsch., **22**, 1907, S. 577; Löhnis, Milchztg., **37**, 1908, S. 484.

Digitized by Google

57. Nachweis von Fremdinfektionen. Beim Auftreten von durch Mikroorganismen hervorgerufenen Milchfehlern[1]) sind die Gärproben zur Ermittlung des Infektionsherdes von größter Bedeutung. Von allen Stellen, an denen eine Infektion möglich ist, d. h. vom Euter bis zum Transportgefäß sind Milchproben in genau bezeichneten, sterilisierten Gläsern aufzufangen und bei geeigneter Temperatur (also bei derjenigen, bei der die betreffende Änderung der Milch besonders deutlich wird, keineswegs immer bei 38—40° C!) aufzubewahren. Nach spätestens 12 Stunden kennt man die Infektionsstelle, und damit sind in der Regel die anwendbaren Bekämpfungsmaßregeln ohne weiteres gegeben. Eingehende mikroskopische und speziell bakteriologische Untersuchungen der von andern Orten eingesandten Milchproben pflegen dagegen keine den Praktiker befriedigende Antwort zu geben.

Es ist das Verhalten von mit geringen Mengen Erde, Kot, Stroh, Heu, Wasser usw. versetzter, bei verschiedenen Wärmegraden aufbewahrter Milch genau zu verfolgen. Ebenso kann der Einfluß der Bakterien in der Stalluft in der Weise demonstriert werden, daß man entweder sterilisierte Milch in Schalen einige Zeit im Stall offen, eventuell unter Zugabe einiger Fliegen, stehen läßt, oder daß man ein größeres Luftquantum durch sterilisierte im Reagenzglas befindliche Milch hindurchsaugt. Wenn möglich, sind aus einem milchwirtschaftlichen Betriebe von den verschiedenen Stellen (Euter, Melkeimer, Filter, Sammelgefäß, Kühler, Transportgefäß usw.) Proben aseptisch zu entnehmen und einer vergleichenden Untersuchung zu unterziehen.

---

[1]) Die Übertragbarkeit des „Milchfehlers" muß selbstverständlich zunächst (durch Impfen sterilisierter und anderer, nicht erhitzter, aber sicher fehlerfreier Milch) festgestellt werden.

Digitized by Google

XIV. Bact. coli und Bact. aërogenes (Aërobacter-Gruppe).

58. Coli-Proben. Die in der Regel auf Kot-Beimengung zurückzuführende Anwesenheit der fast immer stark gasbildenden, auf Geruch und Geschmack der Milch meist sehr ungünstig einwirkenden Darm-Milchsäurebakterien (Bact. coli und Bact. aërogenes) kann vor allem in der Gärprobe (§§ 55, 56) an der stürmischen „Blähung" erkannt werden. Soll die Zahl dieser Keime annähernd bestimmt werden, so sind entsprechende Verdünnungen in Äsculin-Bouillon (§ 49) einzutragen und festzustellen, bis zu welcher Verdünnung noch Schwarzfärbung der Lösung (bei 38—40° C) eintritt. Wurden gleichzeitig Zählplatten angelegt, so kann angegeben werden, wieviel Prozent des gesamten Keimgehaltes auf diese Kotbakterien entfallen.

Außer Bact. coli scheinen nur noch einige, in Milch kaum vorkommende Sproß- und Schimmelpilze die Äsculin-Bouillon schwarz zu färben. Andrerseits geben allerdings nicht sämtliche Coli-Stämme diese Reaktion, so daß die Zahl auch aus diesem Grunde nicht als völlig zutreffend angesehen werden kann.

Handelt es sich darum, Wasser zweifelhafter Beschaffenheit auf Coli-Bakterien zu prüfen, so kann man auch bestimmte Mengen hiervon in Milchzucker-Bouillon (§ 49) eintragen, und eventuell, falls bei 38° C Gärung eintritt, eine nähere mikroskopische und kulturelle Prüfung anschließen.

59. Isolierung von Bact. coli und Bact. aërogenes. Von einer in der Gärprobe kräftig blähenden (nötigenfalls vorher mit einer geringen Kot-Menge versetzten) Milch wird in Milchzucker-Bouillon übergeimpft; sobald hierin (bei 38° C) lebhafte Gasentwicklung eingetreten ist, werden Gußkulturen angelegt. Meist sind dann auf Fleischgelatine-Platten die

Digitized by Google

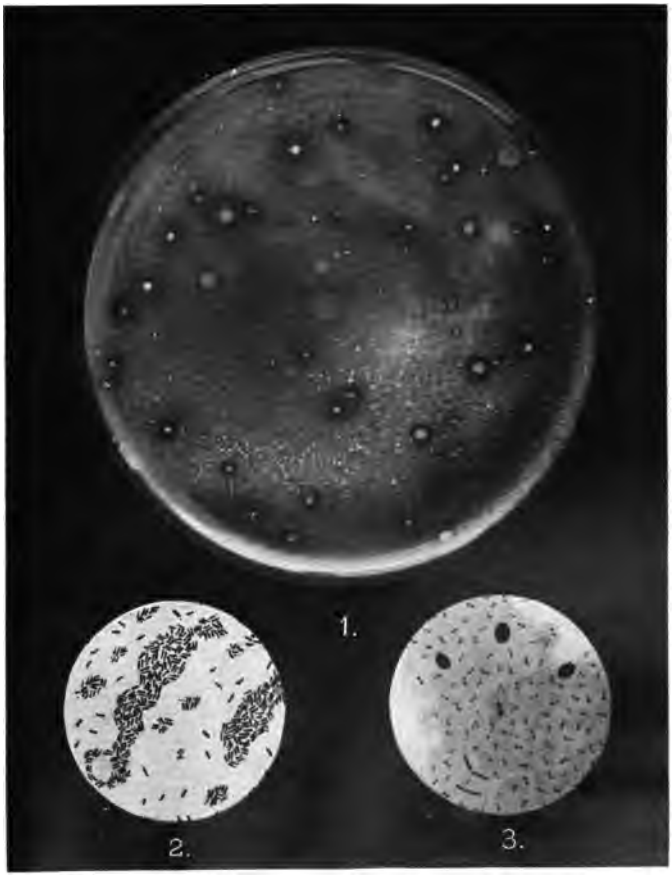
nicht verflüssigenden, vorwiegend kreisrunden porzellanweißen Kolonien des unbeweglichen Aërogenes und die ebenfalls nicht verflüssigenden, aber (besonders bei vorgerückter Entwicklung) mehr blattartigen, häutigen Ansammlungen des Bact. coli unschwer zu erkennen. Um die Gasbildner sicher herauszufinden, kann man auch zunächst Molken-Agar impfen, und wenn dieses in der Schale erstarrt ist, ein zweites Gläschen Agar zur Bildung einer Deckschicht darüber ausgießen. Durch Gasblasen machen sich die gesuchten Kolonien bemerklich. Die Zahl der Varietäten in der Aërobacter-Gruppe ist sehr bedeutend. Namentlich zeigen auch Art und Intensität der Gasproduktion starke Abweichungen.

Die isolierten Stämme sind auf den Standard-Nährböden (§ 4) sowie auf Milchzucker- und Äsculin-Bouillon kulturell und mikroskopisch zu prüfen. In Molken-Gelatine ist eine Schüttelkultur anzulegen (vergl. Abb. 26, S. 50). Unter Benutzung eines oder mehrerer der in § 32 angegebenen Apparate sind Gärversuche anzustellen.

XV. Milchsäure-Bakterien

60. Züchtung von Milchsäure-Bakterien (Kreideagar). Drei Petrischalen sowie ein mit gepulverter Kreide halb gefülltes Reagenzglas sind im Trockenschrank zu sterilisieren. Etwas gleichmäßig gallertig geronnene Milch und drei Gläschen Molken-Agar sind zurechtzustellen. Dann werden Gußkulturen in bekannter Weise (§§ 21 und 34) angelegt, nachdem man vor dem Eingießen des Agars in jede Schale ein kleines Quantum Kreide eingeschüttet hat (etwa $^1/_{10}$ ccm; jedenfalls nur so viel, daß das Agar gleichmäßig getrübt, nicht direkt weiß erscheint). Die Kreide ist mit dem flüssigen Agar durch Hin- und Herneigen gleichmäßig zu vermischen; die Platten werden (umgekehrt mit Glyzerin-

Digitized by Google



1. ***Kreideagar mit Kolonien von Milchsäure-Bakterien*** (§ 60).
2. ***Klatschpräparat von schottischem Cheddarkäse*** (§ 79). **Vergr. 600-fach.**
3. ***Klatschpräparat von Gervaiskäse*** (§ 79). **Vergr. 600-fach.**

Digitized by Google

Digitized by Google

Papier) bei 38° C aufbewahrt. Die säurebildenden Kolonien lösen die in ihrer Nähe befindliche Kreide; sie können an dem klaren Hof in dem getrübten Agar ohne weiteres erkannt werden (vergl. Tafel III, Abb. 1).

Kreidenährböden benutzte zuerst Beijerinck (Centralbl. f. Bakt., 9, 1891, S. 781).

Die entstandenen Kolonien sind genau, auch hinsichtlich der Gestalt der darin vorhandenen Organismen zu prüfen und eine oder mehrere Abimpfungen sowohl auf den Standard-Nährböden wie auf den Molken- und Milchzucker-Nährböden fortzuzüchten (§§ 4 und 49). Reinkulturen müssen in kurzen Zwischenräumen (1 bis 2 Wochen) übergeimpft werden; andernfalls degenerieren sie leicht oder sterben überhaupt ab.

Ausstrichpräparate aus geronnener Milch liefern, nach Behandlung mit Alkohol und Äther (zur Fettlösung) in der gewöhnlichen Weise mit Anilinfarben gefärbt, meist ein wenig klares Bild, weil der geronnene Käsestoff ebenfalls dunkel tingiert erscheint. Kurze Behandlung mit wässerigem Methylenblau gibt hierbei verhältnismäßig noch die besten Resultate. Am wenigsten störend wirken die Niederschläge dann, wenn man das Präparat fünf Minuten in ein Schälchen legt, das 5 ccm Chloroform und 1 ccm konz. alkohol. Methylenblau enthält, dann das Chloroform ablaufen läßt, mit Wasser abspült, trocknet und einschließt (vergl. Utz, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., 11, S. 611).

61. Bestimmung der Milchsäure-Bakterien. Die Zahl der angeblich verschiedenen Arten von Milchsäure-Bakterien ist sehr bedeutend. Tatsächlich handelt es sich aber hierbei meist um einander sehr nahestehende Formen, die höchstens als Varietäten, nicht als getrennte Spezies gelten können. Die überwiegende Mehrzahl aller bisher bekannt gewordenen Milchsäure-Bakterien kann in folgenden vier Gruppen untergebracht werden.

1. Darm-Milchsäure-Bakterien: Ziemlich große Kurzstäbchen; wachsen aërob besser als anaërob, ihr Tempe-

Digitized by Google

ratur-Optimum liegt meist bei 35—40°. Die häufigste Form wird gewöhnlich als *B. aërogenes* bezeichnet; die zuerst eingehend untersuchte, hierher gehörige Varietät ist *B. acidi lactici* Hueppe.

2. Milchsäure-Streptokokken: In Milch gewöhnlich in Diplo- oder Streptokokken-Form (vergl. Abb. 33 b, S. 74), auf Fleischnährböden oft auch Kurzstäbchen-Form annehmend; wachsen in der Regel anaërob besser als aërob, das Temperatur-Optimum pflegt bei 25—30° C zu liegen. Die häufigste Form ist der *Streptococcus lactis*, früher auch als Bact. lactis Lister, Bact. Güntheri Lehm. et Neum., Bact. lactis acidi Leichmann u. a. bezeichnet.

3. Laktobazillen: Mehr oder minder lange, schlanke bis fadenförmige Stäbchen, wachsen anaërob besser als aërob, das Temperatur-Optimum pflegt bei 40—45° C zu liegen. Diese Formen sind am häufigsten in fermentierter Milch (Jaourt usw.) und in Käse. Sie werden als *Bact. caucasicum* oder *B. casei* bezeichnet.

4. Milchsäure-Mikrokokken: Kreisrunde, einzeln oder in Haufen (nicht in Ketten) liegende Zellen; wachsen besser aërob als anaërob, das Temperatur-Optimum pflegt bei und unterhalb 20° C zu liegen. Die häufigsten Formen werden, wenn sie die Gelatine verflüssigen, als *Micr. acidi lactis*, wenn sie nicht verflüssigen, als *M. lactis acidi* bezeichnet.

Nach dem Auftreten oder Ausbleiben der Gasbildung, Gelatine-Verflüssigung und Farbstoffbildung können verschiedene Typen ausgesondert werden (vergl. die Bestimmungs-Tabelle im Anhang I), die aber durch Übergänge verbunden sind. Wegen der ersten Gruppe vergl. Kap. XIV. Mit den Laktobazillen, die aus gewöhnlicher Marktmilch nur mit Hilfe geeigneter Anhäufungs-Methoden leicht zu isolieren sind, werden wir uns in den Kap. XVIII und XXIII näher zu beschäftigen haben. Milchsäure-Mikrokokken sind dann ziemlich häufig in Milch anzutreffen, wenn diese längere Zeit (8 bis

Digitized by Google

14 Tage) bei niedriger Temperatur (2—5° C) gehalten wurde, ebenso sind sie in der (kalt aufbewahrten) Butter ziemlich häufig, vergl. Kap. XX. In der bei Zimmertemperatur normal gerinnenden Milch herrschen dagegen die Milchsäure-Streptokokken regelmäßig bei weitem vor.

Im Gegensatz zu den Mikrokokken und den der Aërobacter-Gruppe angehörenden Formen bezeichnet man die Milchsäure-Streptokokken und die Laktobazillen gemeinsam als „echte" Milchsäure-Bakterien. Selten und praktisch unwichtig sind einige ebenfalls zur Milchsäure-Bildung befähigte sporenbildende Bakterien und Vibrionen. Dagegen können sich milchsäure-produzierende Sproßpilze an der Rahmreifung beteiligen (vergl. § 75).

Literatur: Löhnis, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., 18, S. 97 bis 149 (Zusammenstellung der bis 1907 beschriebenen Formen und Aufstellung der Gruppen-Diagnosen), ebenda 22, S. 553 f. und Handbuch der landw. Bakteriologie, 1910, S. 192—202.

XVI. Labproduzierende Bakterien. Kaseïn-Lösung

62. Produktion von Säure, Lab und proteolytischem Enzym. Nicht wenige der verschiedenen Formen von Milchsäure-Bakterien produzieren neben Säure mehr oder minder große Mengen Lab. Besonders unter den Mikrokokken sind die (von Gorini) als *Säure-Lab-Bakterien* bezeichneten Organismen häufig. Aber auch Streptokokken, weiße und pigmentbildende Kurzstäbchen, sowie sporenbildende Bazillen können die gleiche Doppelwirkung auf Milch ausüben. Die Säurebestimmung in den Milchkulturen gibt die entsprechende Auskunft.

Fast immer folgt der Labwirkung eine mehr oder minder lebhafte Auflösung des Coagulums. Diese kann auch allein in die Erscheinung treten. Desgleichen gehen Gelatine-Verflüssigung und Kaseïn-Lösung zwar oft, aber nicht immer Hand in Hand.

Digitized by Google

63. Kultur auf Milchagar. Man vermischt 100 ccm Leitungswasser (ohne alle Zusätze) mit 3 % Agar, füllt (nach dem Lösen und Filtrieren) jedesmal 4—5 ccm in einige Reagenzgläser und sterilisiert. Man bringt einige Gläschen mit dem geschmolzenen Agar und die gleiche Zahl Milch-Röhrchen auf eine Temperatur von 50° C und entleert je ein Milch- und eines der Agar-Gläser in eine vorher ebenfalls angewärmte, sterile Petrischale, in der man durch Hin- und Herneigen für eine gleichmäßige Verteilung von Milch und Agar sorgt[1]).

Nach dem Festwerden stellt man die Milchagar-Platten einige Tage (zum Abtrocknen) in den Thermostaten (von 38° C). Zieht man dann auf das so hergestellte Substrat Striche von Reinkulturen — eventuell von zwei verschiedenen Arten übers Kreuz (zwecks Feststellung von Symbiose oder Antagonismus, vergl. § 45) — so können die in der Nähe des Striches auftretenden weißen Niederschläge sowohl auf Säure- wie auf Lab-Wirkung zurückzuführen sein. Betupfen mit Sodalösung bringt jene zum Verschwinden, diese nicht. Proteolytisch wirkende Enzyme lassen eine klare Zone entstehen.

Setzt man in ähnlicher Weise dem (salzhaltigen) Fleisch-Agar beim Plattengießen Milch, aber nur in Mengen von ca. 10 % zu, so rufen auch säurebildende Bakterien eine teilweise Aufhellung hervor. Wenig Säure macht das Kaseïn in Kochsalz löslich, viel Säure bringt es wieder zum Ausfallen; in jungen Käsen spielt dieser Vorgang eine wichtige Rolle. Ein Strich von Streptoc. lactis ist deshalb auf der Milch-Fleisch-Agarplatte von einer außen hellen, innen opaken Zone umgeben, und die proteolytisch wirkenden

[1]) Milch und Agar können nicht zusammen sterilisiert werden; die Milch würde dabei in groben Flocken gerinnen.

Digitized by Google

Säure-Lab-Bakterien zeigen zwei, durch eine opake Grenzschicht getrennte Aufhellungen.

Die eigentliche Labwirkung kommt infolge der starken Verdünnung der Milch auf dieser Art von Milchagar-Platten nicht oder nur wenig zum Ausdruck.

Literatur: Hastings, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., 12, S. 590 ff. (Photogramme), Van der Leck, ebenda 17, S. 368 ff.

64. Kultur auf Kaseïn. In Milchkulturen von Milchsäurebakterien, die vier bis sechs Wochen (durch Gummikappen vor Verdunstung geschützt! vergl. § 14) bei 38° C gestanden haben, pflegen sämtliche Keime abgestorben zu sein (Kontrolle durch Abimpfung). Sie können zur Prüfung säurezehrender und proteolytisch wirkender Formen benutzt werden. Man kann auch durch Lab oder durch Säure ausgefällten Käsestoff (im letzteren Falle nach mehr oder minder vollständiger Entfernung der Säure durch Auswaschen mit destilliertem Wasser) sterilisieren und entweder allein oder nach Zugabe von wenig Fleischextrakt und (oder) Traubenzucker mit den betreffenden Kulturen impfen.

Literatur: Hüppe, Methoden der Bakterien-Forschung, 5. Aufl., 1891, S. 389; Grimm, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., 8, S. 588.

XVII. Aromaproduktion. Schleimbildung

65. Aroma-Bakterien. Eine ziemlich große Zahl verschiedener Spezies kann mitunter zum Auftreten eines angenehm obstartigen Aromas in Milch Veranlassung geben. Die betreffenden Reinkulturen pflegen jedoch diese Eigenschaft nicht lange beizubehalten; oft tritt statt dessen die Produktion von unangenehm (faulig, urinartig) riechenden Substanzen mehr oder minder deutlich zutage. Praktisch (für die Rahm- und Käsereifung) sind jedenfalls auf Geruch und Geschmack günstig einwirkende Rassen von Milchsäure-Streptokokken, Laktobazillen und eventuell von Hefen weit wichtiger als die sog. spezifischen Aromabakterien.

Digitized by Google

Nach Van der Leck (Centralbl. f. Bakt., II. Abt., 17, S. 650) kann man diese in der Weise anhäufen, daß man gewöhnliche, keimreiche Marktmilch im Erlenmeyer-Kolben auf 30° C erwärmt, mit 0,01 % Lab vermischt, in Petrischalen (1 cm Schichthöhe) ausgießt und, nachdem bei 30° C Koagulation eingetreten ist, bei 23° C aufbewahrt. Sobald der Obstgeruch deutlich wird (meist nach 24 Stdn.) werden Molken-Gelatine-Platten gegossen. In der Regel handelt es sich um schwach oder nicht säuernde, nicht gasbildende Parallelformen zu B. aërogenes und coli. Doch können auch Mikrokokken, Fluoreszenten, Sporenbildner u. a. beteiligt sein.

66. Schleimbildung. Die Mehrzahl der existierenden Schleimbildner steht in nahen verwandtschaftlichen Beziehungen zu den Milchsäurebakterien. Doch gibt es auch unter den Sporenbildnern kräftige Schleimproduzenten; ebenso sind solche Rassen von Oidium lactis nicht allzu selten. Gelegentlich kann diese Eigenschaft längere oder kürzere Zeit bei Vertretern aller vier Gruppen von Milchsäure-Bakterien hervortreten (Verschleimen der Säurewecker!). Indessen pflegt die Befähigung zur Schleim-Erzeugung meist wenig beständig zu sein; relativ am konstantesten erwiesen sich gewisse Mikrokokken (z. B. M. pituitoparus Hohl). Längere Aufbewahrung der Milch bei niedrigen Temperaturen scheint die Schleimbildner in der Entwicklung zu begünstigen. Ziemlich sicher kann man solche Formen anhäufen, wenn man Milch mit 5 % Chlorcalcium versetzt, mit ein wenig Erde, Stallschmutz und dergl. infiziert und bei 5—15° C 4—8 Tage kultiviert.

67. Kapselfärbung. Bei schleimbildenden Bakterien ist der Unterschied in den Größenverhältnissen der ungefärbten und der gefärbten Zellen (vergl. § 26) oft besonders groß infolge der Ausbildung einer bei der gewöhnlichen Färbungsmethode nicht mit tingierten, mehr oder minder zähen Schleimhülle (Kapsel). Diese kann man (nach Johne) folgendermaßen sichtbar machen:

Digitized by Google

1. Das fixierte Ausstrichpräparat wird mit 2-proz. wässeriger Gentianaviolett-Lösung bis zur Dampfentwicklung erwärmt.

2. Nach Abspülen mit Wasser wird mit 2-proz. Essigsäure 6—10 Sekunden benetzt und mit Wasser abgespült.

3. Das Präparat ist in Wasser zu betrachten; Canadabalsam bringt die Kapseln gewöhnlich zum Verschwinden.

XVIII. Fermentierte Milch [1])

68. Organismen-Bestand. Während in der gewöhnlichen, bei ca. 20° C entstehenden Sauermilch die Milchsäure-Streptokokken weitaus vorherrschen, sind die verschiedenen, besonders im Orient sehr verbreiteten, bei

a b c d

Abb. 37. Fermentierte Milchsorten. Vergr. 700-fach.
a) Kefir, b) Jaourt, c) Mazun, d) Kumiß.

30—45° C bereiteten fermentierten Milchsorten (Kumiß, Jaourt, Mazun, Dadhi usw.) besonders reich an *Laktobazillen* und ziemlich reich an *Hefen* (Abb. 37). Nur in dem bei etwa 20° C hergestellten Kefir treten die Laktobazillen (mitunter bis zum völligen Verschwinden) zurück. Neben

[1]) Bei regulärer Durchführung der Übungen dürfte der nach § 49 hergestellte Vorrat an Nährböden ziemlich erschöpft sein. Es sind für die weiteren Untersuchungen (etwa bis Kap. XXIII) bereitzustellen: je 30 Gläschen Fleischgelatine, Fleischagar, Molkengelatine und Molkenagar, je 15 Gläschen Traubenzucker-Agar, Bouillon, Milchzucker-Bouillon und Kartoffeln.

Digitized by Google

Streptokokken und Hefen sind hier einige säureproduzierende Sporenbildner aktiv. Wegen Gewinnung möglichst klarer Ausstrichpräparate vergl. § 60.

Literatur betr. *Kumiß:* Rubinsky, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **28**, S. 161—219; *Jaourt:* Kuntze, ebenda, **21**, S. 737 bis 768; *Mazun:* Düggeli, ebenda, **15**, S. 594 ff., Weigmann, Th. Gruber und Huß, ebenda, **19**, S. 70—87; *Dadhi:* Chatterjee, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., **53**, S. 103—112; *Kefir:* Beijerinck, Archives néerlandaises, **22**, S. 428 ff., Adametz, Österr. Monatsschr. f. Tierheilkde., **15**, S. 72 f., v. Freudenreich, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **3**, S. 47, 87, 135, Kuntze, ebenda, **24**, S. 101—122.

69. Züchtung der Laktobazillen. Auf den Fleisch-Nährböden und auf der Kartoffel pflegt das Wachstum sehr gering zu sein oder gänzlich auszubleiben. Verhältnismäßig kräftig ist es dagegen auf mit Milch und Molken hergestellten Substraten. Die hierher gehörigen Formen vertragen relativ viel Säure (sog. *acidophile* Bakterien). Zur Anhäufung wurde demgemäß mit $^1/_2$ bis 1% Essigsäure versetzte Bouillon empfohlen. Besser wirken Milch oder Molken, denen 1% Pepton oder 6—8% *Hefeextrakt* zugesetzt wurden. Dieses bereitet man (nach Rubinskys Vorschlag) folgendermaßen: 100 g Preßhefe werden mit 100 ccm Wasser zu einem gleichmäßigen Brei verrührt und (zur Verhinderung des Überlaufens) in einem geräumigen Becherglase $^1/_2$ bis 1 Stunde im Dampftopf erhitzt, dann 2—3mal durch Papier filtriert. Das gewonnene Filtrat kann in einem kleinen Kolben sterilisiert und vorrätig gehalten werden. Der in Reagenzgläsern befindlichen Milch oder Molke setzt man $^1/_2$ ccm Hefeextrakt zu. Hefeextrakt-Molke ist für die mikroskopische Prüfung vorzuziehen. Durch 2—3maliges Überimpfen kann man die Laktobazillen aus Marktmilch, Sauerkraut, Sauerfutter, Dünger, Erde usw. bei 40° C anhäufen.

Digitized by Google

In den Gußkulturen (bei 38—40° C) erscheinen die meist erst nach 3—4 Tagen sichtbar werdenden Kolonien teils von derselben Form und Größe wie diejenigen der Milchsäure-Streptokokken, teils bilden sich stark verzweigte, wie kleine Haarknäuel aussehende Ansammlungen. Bei Zimmertemperatur bleibt meist jedes Wachstum aus. Kreide wird, wie von den Streptokokken, gelöst. Die Säureproduktion verläuft in der Regel langsamer als bei diesen, doch pflegt die schließlich vorhandene Säuremenge wesentlich größer zu sein. Entsprechende Versuche sind auszuführen.

70. Züchtung von Milchhefen. Die Kolonien der Hefen aus fermentierter Milch sind in den Gußkulturen ohne weiteres zu erkennen (sehr grobe Granulierung). Schwieriger ist der Nachweis der in Marktmilch fast regelmäßig, aber meist nur in geringer Zahl vorhandenen Hefezellen. Um diese anzuhäufen, kann man (nach Troili-Petersson) die Milch mit 2% einer 3-proz. Wasserstoff-Superoxydlösung (um das 10-fache verdünntes *Perhydrol*) versetzen und bei 37° C kultivieren. Säuerung unterbleibt, statt dessen tritt (beim Vorhandensein der gesuchten Organismen) Hefengeruch und Gärung, oft auch Käsestofflösung hervor. Die definitive Isolierung der Hefen macht zuweilen Mühe; besonders die schlanken Laktobazillen bleiben leicht an den relativ großen Hefezellen haften, so daß überwiegend Mischkolonien entstehen. Die Ein-Zell-Kultur (§ 48) kann auch in diesem Falle mit Nutzen Verwendung finden. Vergl. auch § 85.

Die gewöhnlich zum Alkohol-Nachweis benutzte *Jodoform-Reaktion* wird derart ausgeführt, daß man bei neutraler Reaktion Alkohol, Aldehyde, Aceton usw. abdestilliert, dem schwach erwärmten Destillat (ca. 5 ccm) 5—6 Tropfen 10-proz. wässerige Kalilauge und tropfenweise Jod-Jodkalium-Lösung zufügt, bis Braunfärbung eintritt. Diese bringt man durch einen Tropfen

Digitized by Google

Kalilauge zum Verschwinden. Die drei genannten Substanzen veranlassen Jodoformgeruch und Abscheidung sechseckiger Jodoform-Täfelchen (Prüfung bei schwacher Vergrößerung). Schon infolge des Sterilisierens im Dampf kann die Milch Jodoform-Reaktion geben. Kontroll-Versuche sind nötig.

XIX. Erhitzte Milch. Anaërobe Milchbakterien

71. Peroxydasen-Reaktion. Zum Nachweis der bei ca. 80° C erfolgenden Zerstörung der Oxydasen und Peroxydasen in Milch wurden zahlreiche Reaktionen in Vorschlag gebracht. Am besten bewährte sich die von Rothenfußer angegebene Modifikation der Storchschen Probe. Die zu prüfende Milch oder besser das daraus durch Fällung mit Bleiessig (100 ccm Milch + 6 ccm Bleiessig) gewonnene Serum wird versetzt mit einer Para-Phenylendiamin-Guajakol-Mischung, die in folgender Weise hergestellt wird: Man löst 1 g Para-Phenylendiamin-Chlorhydrat in 15 ccm destill. Wasser und fügt dazu eine Lösung von 2 g kristallisiertem Guajakol in 135 ccm 96-proz. Alkohol (in dunkelbrauner oder schwarzer Flasche aufzubewahren).

Literatur: Rothenfußer, Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- und Genußmittel, **16**, 1908, S. 63—74, Milchw. Centralbl., **6**, 1910, S. 468; A. Hesse und Kooper, Milchw. Centralbl., **6**, 1910 S. 412—420.

72. Keimgehalt erhitzter Milch. Der nicht selten recht bedeutende Keimgehalt der pasteurisierten und der sog. „sterilisierten" Milch des Handels kann mit Hilfe der Katalase-Probe meist rasch nachgewiesen werden (vergl. § 53). Es ist jedoch zu beachten, daß nicht katalytisch wirkende Organismen (z. B. Buttersäure-Bakterien) eventuell zu Täuschungen Veranlassung geben können.

Die Gärproben (§ 55) werden ebenfalls zweckmäßig in etwas modifizierter Form zur Prüfung erhitzter Milch

Digitized by Google

verwendet, speziell auch zur Ermittlung der Art der überlebenden Keime. Die am besten in kleinen Flaschen mit Bügelverschluß befindliche Milch wird, damit sicher kochfeste Sporen vorhanden sind, mit ein wenig Erde versetzt und die eine Flasche 5—10 Minuten bei 70—80° C, die andere 5—10 Minuten bei 100° C pasteurisiert. Nach kurzer Aufbewahrung im Brutschrank (bei 38° C) pflegt die erste Probe lebhafte Buttersäure-Gärung zu zeigen, während in der zweiten meist die sog. „peptonisierenden" (käsestofflösenden) Bakterien vorherrschen.

73. Züchtung der Milch-Anaëroben. Aërobe Gußkulturen der Gärproben erhitzter Milch ergeben verschiedene Formen der Subtilis- und der Mesentericus-Gruppe. Das gefärbte Ausstrichpräparat läßt aber außerdem in der Regel verschiedene interessante Formen erkennen, die nur bei anaërober Züchtung zur Entwicklung kommen. Unter Berücksichtigung des in §§ 41—43 Gesagten ist die Anaëroben-Kultur unter Verwendung von Fleisch- und Molken-Nährböden durchzuführen. Wegen der Identifizierung der obligaten Anaëroben s. Anhang I (Bazillus). Der unbewegliche Buttersäure-Bazillus sowie B. putrificus pflegen verhältnismäßig noch am häufigsten zu sein. Sie stammen aus dem Dünger, werden aber auch von hier aus in die Stalluft übertragen, in der sie (durch Aufstellen von Milchschalen) leicht nachgewiesen werden können.

Pasteurisiert man gewöhnliche Marktmilch (ohne Erdzusatz) in der oben angegebenen Weise, und überträgt man davon (unter Ausschluß von Fremdinfektionen) bestimmte Mengen $^1/_{100}$, $^1/_{10}$, 1, 5 ccm) in sterilisierte Milch, die man unter Luftabschluß aufbewahrt, so kann man sich ein annähernd richtiges Urteil über die (in sauberer Milch meist nur kleine) Zahl der vorhandenen Anaëroben verschaffen.

Digitized by Google

XX. Keimgehalt der Butter

74. Butter-Ausstrichpräparate. Verschieden alte, Süß- und Sauerrahm-Butter wird in Mengen von je ca. 1 g in kleinen Bechergläsern oder Schälchen mit wenig (ca. 25 ccm) 60—70° C warmem Wasser gründlich vermischt. Aus der Emulsion wird durch Zentrifugieren (nach § 51) das bakterienhaltige Sediment gewonnen, das zu gefärbten Ausstrichpräparaten zu verarbeiten ist.

Der Nachweis der in Butter nicht allzu seltenen, wegen ihrer verwandtschaftlichen Beziehungen zu den Tuberkelbazillen beachtenswerten sog. „säurefesten" Bakterien wird derart geführt, daß man das fixierte Ausstrichpräparat fast genau nach der im § 36 angegebenen Sporen-Färbungs-Methode behandelt, die man nur dahin modifiziert, daß man die Behandlung mit dem erwärmten Karbolfuchsin auf zwei Minuten abkürzt. Die etwa vorhandenen (gegen die Entfärbung durch Säure-Alkohol in gleicher Weise wie die Tuberkelbazillen widerstandsfähigen) „säurefesten" Butterbakterien erscheinen dann als rote Stäbchen neben den anderen blaugefärbten Zellen.

75. Keimgehalt der Butter. In frischer Butter sind meist zwischen 2 und 40 Millionen Keime pro Gramm gezählt worden. Süßrahm-Butter pflegt in den ersten Tagen und Wochen der Aufbewahrung eine Keimvermehrung erkennen zu lassen; weiterhin tritt hier, wie bei der Sauerrahm-Butter von vornherein ein Rückgang ein. Sehr alte Butter enthält in der Regel nur einige hundert Keime. Manche Buttersorten sind sehr reich an Sproßpilzen.

Unter Berücksichtigung der Qualität der zu untersuchenden Proben sind Verdünnungen und Gußkulturen analog den in § 50 enthaltenen Angaben anzufertigen. Das zur Verdünnung dienende Wasser wird vorher auf 40° C angewärmt, sodaß die Butter (zur I. Verdünnung je 1 g) leicht darin emulgiert werden kann.

Digitized by Google

Für das *sterile Abwägen* von Butter, Käse und ähnlichen Substanzen sterilisiert man (im Trockenschrank) in einer Petrischale eine größere Zahl Filtrierpapierscheiben von 9 cm Durchmesser, in einer zweiten solche von 7 cm Durchmesser. Auf die Wagschale wird mittels sterilisierter Pinzette erst die größere, dann die kleinere Papierscheibe aufgelegt und (nach dem Tarieren) die letztere als Unterlage für die zu wägende Substanz benutzt, die man mit einem sterilisierten Messer, Löffel oder dergl. entnimmt. Zusammen mit der kleineren Papierscheibe wird dann das Material in das I. Verdünnungs-Gläschen gebracht.

Die auf den verschiedenen Substraten auftretenden Kolonien sind auszuzählen und die am häufigsten vorkommenden Arten näher zu untersuchen.

76. Prüfung des Säureweckers. Soweit Sauerrahm-Butter in Frage kommt, ist die Beschaffenheit des Säureweckers von hervorragendem Einfluß auf die Qualität der Butter bezw. auf die diese bedingende Mikroflora des fertigen Produktes. Die Prüfung hat sich auf folgende vier Punkte zu erstrecken:

1. Reinheit (Ermittlung des Organismen-Bestandes auf Molken- und Fleischagar),

2. Säuerungs-Intensität (Feststellung der Wirksamkeit bei 20—30° C. nach an 3 Tagen wiederholten fortlaufenden Überimpfungen der Originalkultur in sterilisierter Milch),

3. Einwirkung auf Geschmack und Aroma des Rahmes und der Butter,

4. Konstanz der Eigenschaften (Prüfung der Beständigkeit der Säureproduktion bei lange Zeit hindurch unter zusagenden Kultur-Bedingungen fortgesetzter Übertragung).

Digitized by Google

Literatur: L. Russell and Hastings, Experimental Dairy Bacteriology, 1909, S. 98 ff.

XXI. Fettzersetzung.

77. Anhäufung fettzersetzender Keime. In 100 ccm Leitungswasser werden gelöst: 0,1% KNO_3, 0,1% NH_4Cl und 0,05% K_2HPO_4. Die Lösung wird in kleine Erlenmeyer-Kolben in sehr flacher Schicht verteilt und im strömenden Dampfe sterilisiert. Danach werden 0,3—0,5% Butyrin, Tripalmitin, Tristearin, Triolein oder Schweineschmalz in feinster Verteilung hinzugefügt und mit dem zu untersuchenden Material (Butter, Säurewecker, Wasser usw.) geimpft. Es wird bei 37° C kultiviert und nachdem Entwicklung eingetreten ist, in die gleiche Lösung übergeimpft. Zur mikroskopischen Prüfung ist das Tusche-Ausstrichpräparat (§ 24) am besten geeignet.

78. Kultur auf Fettagar. Zum Herausfinden fettspaltender Kolonien bedient man sich eines mit Fett versetzten Agars, das in verschiedener Weise bereitet werden kann. Auf *Butyrinagar*, d. i. Fleischagar, dem nach dem Sterilisieren 0,5% Butyrin beigemischt wurde, pflegen die Keime aus der oben angegebenen Anhäufungskultur ebenso wie die aus ranziger Butter Kolonien zu liefern, die das schwach getrübte Butyrinagar lokal aufhellen und so zu einem ähnlichen Bilde Veranlassung geben wie die Milchsäure-Bakterien im Kreideagar.

Die Zahl der fettspaltenden Arten ist ziemlich beträchtlich. Besonders sind Fluoreszenten und deren farblose Parallelformen (Bact. punctatum), Mikrokokken sowie Sproß- und Schimmelpilze für die Zerlegung der Fette in Butter, Käse usw. verantwortlich zu machen.

Ausführliche Angaben über das (besonders durch O. Jensen eingehend klargelegte) Ranzigwerden und über sonstige abnorme

Digitized by Google

Änderungen des Butterfettes finden sich in meinem Handbuch der landw. Bakteriologie, 1910, S. 309—319.

XXII. Keimgehalt des Käses

79. Schnitt- und Klatschpräparate. Einfache, gefärbte Ausstrichpräparate aus Käse geben in der Regel kein genügend klares Bild. Dagegen kann man sich mit Hilfe von Schnittpräparaten recht gut sowohl über die Formen wie namentlich auch über die Lagerung der Keime im Käse orientieren. Da die Anfertigung hinreichend dünner Schnitte oft Schwierigkeiten bereitet, ist es vorzuziehen, würfelförmige Käsestücke (mit glatten Schnittflächen) herzustellen, diese zwischen zwei saubere Objektträger zu legen und die nach leichtem Andrücken entstandenen Klatschpräparate in bekannter Weise zu fixieren und nach dem Entfetten zu färben (vergl. § 60). In Hartkäse-Präparaten werden die lokalen Bakterien-Ansammlungen deutlich sichtbar, die man (nach Rodella) als „Reifungszentren" bezeichnen kann (Tafel III, Abb. 2, S. 82). Weichkäse liefern dagegen, namentlich in jugendlichem Zustande, die typische „Zerstreuungsform" (Tafel III, Abb. 3); zur Gewinnung klarer Bilder ist hier die Benutzung des Chloroform-Methylenblau (§ 60) besonders angezeigt.

80. Keimzahlen im Käse. Die Rinde junger Käse pflegt mehrere Milliarden, das Innere viele Millionen Keime zu enthalten. Oft schon am ersten oder doch nach wenigen Tagen ist das Maximum in der Entwicklung erreicht; mit fortschreitender Reife sinkt die Zahl mehr und mehr. Da die gleichmäßige Verteilung der einzelnen Zellen, ebenso wie deren Kultivierung z. T. auf Schwierigkeiten stößt, sind die meisten der in der Literatur angegebenen Zahlen zu klein.

Digitized by Google

Je 1 g Käse (aseptisch entnommen und gewogen nach der in § 75 beschriebenen Methode) verreibt man in sterilisierter Reibschale, eventuell unter Zuhilfenahme von sterilem Quarzsand oder Glaspulver, mit ca. 10 ccm sterilisiertem Leitungswasser, bringt das Gemisch in einen trocken sterilisierten Meßkolben (1000 ccm) und füllt mit sterilisiertem Leitungswasser bis zur Marke auf. Nach mehrere Minuten fortgesetztem Schütteln werden die weiteren Verdünnungen in Reagenzgläsern (mit je 9 ccm Wasser) hergestellt; meist $^1/_{10\,000}$ bis $^1/_{1\,000\,000}$, nur bei jungen Käsen, entsprechend den obigen Angaben, bis $^1/_{1\,000\,000\,000}$ g. Je 1 ccm von diesen Verdünnungen (d. h. $^1/_{100\,000}$ bis $^1/_{10\,000\,000}$ g usw.) bringt man in die Petrischalen und vermischt hier mit Agar bezw. Gelatine (vergl. § 50). Gleichzeitig sind mit denselben Verdünnungen geschmolzene, bei 45° C gehaltene Agargläschen (Molken-Agar) zu infizieren, die in Burri-Röhren eingefüllt werden (vergl. §§ 20 und 41). Da die im Käse vorhandenen Keime im allgemeinen die Anaërobiose bevorzugen, so liefert das zuletzt angegebene Verfahren (bei 38—40° C) in der Regel die höheren Keimzahlen. Nur die Rinde von Hartkäsen und flache (deshalb im Gegensatz zu den dickeren Käsen sauerstoffhaltige) Weichkäse pflegen mehr aërobe Organismen zu enthalten. Die am häufigsten vorkommenden Keime sind abzuimpfen und zu bestimmen.

Zur rascheren Erledigung dieser Zählungen kann wiederum Arbeitsteilung (nach § 50) von Nutzen sein.

Näheres über die Mikrobiologie der verschiedenen Käsesorten findet sich in Teil III, 3 meines „Handbuchs der landwirtschaftlichen Bakteriologie", Zahlen speziell in Abschnitt A, Kap. 2.

Digitized by Google

XXIII. Käse-Milchsäurebakterien. Anaërobe Käsebakterien[1])

81. Käse-Milchsäurebakterien. Die Mehrzahl der unter aëroben wie unter anaëroben Bedingungen aus Käse zur Entwicklung kommenden Keime sind Milchsäurebakterien, und zwar können Vertreter aus allen vier Gruppen (§ 61) gefunden werden. Wie in reiner Milch treten in gutem Käse die Darm-Milchsäure-Bakterien bis zum völligen Verschwinden zurück; in fehlerhaften, insbesondere in geblähten Käsen sind sie dagegen meist recht zahlreich. Die Gasbildung durch B. aërogenes und dessen Verwandte spielt in diesem Falle eine wichtige Rolle. Die Milchsäure-Mikrokokken sind, da sie ziemlich luftbedürftig sind, mehr auf die äußeren Partien der Käse angewiesen. Namentlich gelatineverflüssigende Formen dieser Gruppe werden in der Rindenschicht junger Käse konstant angetroffen. Weitaus am häufigsten sind aber Streptokokken und Laktobazillen, jene in den bei relativ niedriger Temperatur hergestellten, diese in den mehr oder minder hoch nachgewärmten Käsesorten. Emmentaler Käse pflegt bereits bei direkter Aussaat in Molken-Agar in Burri-Röhren die charakteristischen kleinen „Haarknäuel" in sehr großer Zahl zu liefern; bei den andern Käsen ist es meist empfehlenswert, die Laktobazillen zunächst in Hefeextrakt-Molken anzuhäufen (s. § 69).

Nach O. Jensen (Centralbl. f. Bakt., II. Abt., 4, S. 196) ist auch peptonisierte Milch für die Käse-Milchsäurebakterien besonders geeignet. Diese wird folgendermaßen bereitet: 1 L sterilisierte Milch wird mit 10 ccm reiner, konz. Salzsäure (33 % HCl) und 2 g reinem

[1]) Vor Beginn dieser Übung sind nötigenfalls die für Kap. XXIII und XXIV erforderlichen Nährböden fertig zu stellen (vergl. § 49 und Kap. XVIII, Anm. 1).

Digitized by Google

Pepsin (Pepsin. german. pur. gran.) versetzt. Die Mischung wird unter wiederholtem Umschütteln 36—48 Stunden bei 35—37° C gehalten. Dann wird neutralisiert, 10 Minuten im Autoklaven auf 115—120° C erhitzt, filtriert und die Acidität so geregelt, daß 5 ccm (bei Phenolphthaleïn-Zusatz) 1—2 ccm $^1/_{10}$-Normal-Lauge binden. Nach erfolgtem Klären mit Eiweiß wird nochmals filtriert und eventuell Gelatine bezw. Agar hinzugefügt.

Besonders in der Gruppe der Milchsäure-Mikrokokken sind kaseïnlösende Formen häufig; doch auch unter den Streptokokken und Laktobazillen sind solche anzutreffen. Die isolierten Stämme sind auf Milchagar, eventuell auch auf Kaseïn zu prüfen (vergl. §§ 63 und 64).

82. Anaërobe Käsebakterien. Mit wenigen Ausnahmen sind die Käse ebenso arm an obligat anaëroben Bakterien wie die Milch (§ 73). Eine Ausnahme bildet z. B. der „Schabzieger" (Kräuterkäse), in dem streng anaërobe Buttersäurebakterien sich an der Reifung wesentlich mit beteiligen. Dagegen sind die Eiweißzersetzer aus der Verwandtschaft des B. putrificus relativ selten und von nebensächlicher Bedeutung.

Zur Anhäufung kann man sich des in § 72 angegebenen, entsprechend modifizierten Verfahrens bedienen (sterilisierte Milch, geimpft mit Käse statt mit Erde). Um speziell die eiweißzersetzenden Anaëroben anzureichern, bringt man die Käse-Emulsion in ein Reagenzglas, in dem sich ein Würfel hartgekochtes Hühner-Eiweiß in der 4—5 fachen Wassermenge befindet, und verschließt nach Wright-Burri (§ 42). Doch sind hierbei Täuschungen nicht ausgeschlossen, insofern mit übertragene Enzyme die Eiweißlösung bewirken können.

83. Bildung von flüchtigen Fettsäuren und von Gasen. Zum Teil verdanken die für Geruch und Geschmack des Produktes nicht unwichtigen freien Fettsäuren ihre Existenz der Tätigkeit fettspaltender Organismen. Deren Isolierung erfolgt nach § 78. Außerdem aber kommen hier sowohl der Eiweißabbau wie die

Digitized by Google

Vergärung von Laktaten, Succinaten, Glyzerin u. a. in Betracht. Die für die Augenbildung in den Hartkäsen verantwortlich zu machenden Gasmengen sind vorwiegend auf diese Prozesse zurückzuführen. Zur Anhäufung der an den zuletzt genannten Umsetzungen beteiligten Organismen kann (nach O. Jensen) folgende Lösung benutzt werden: 100 Leitungswasser, 2 Pepton Witte, 0,5 NaCl, 0,2 KH_2PO_4, 0,05 $MgSO_4$ und 2 Ca-Laktat oder 1,0 Ca-Succinat oder 5 Glyzerin. Nach mehrfacher Überimpfung kann zur Isolierung auf Molken-Agar geschritten werden.

Literatur zu §§ 81—83: Löhnis, Handbuch der landw. Bakteriologie, Teil III, 3 Abschnitt A, Kap. 3 und Abschnitt B, Kap. 4.

XXIV. Verflüssigende Bakterien. Sproß- und Schimmelpilze

84. Verflüssigende Bakterien. Außer den kaseïnlösenden Milchsäurebakterien finden sich besonders in den äußeren Partien der Käse verschiedene andere Arten, die den Käsestoff in lösliche Form überführen und meist auch Gelatine verflüssigen. Soweit die Käsestoff-Lösung bei schwach saurer Reaktion von statten geht, handelt es sich um die von Gorini als *Säure-Lab-Bakterien* bezeichneten Organismen, die allerdings z. T. mit den kaseïnlösenden Milchsäurebakterien identisch sind (vergl. § 62). Ferner lösen die an der *Rot- oder Braunfärbung* der Rindenschicht beteiligten Bakterien den Käsestoff, während nur einige von ihnen auch die Gelatine verflüssigen.

Die kräftig Gelatine-verflüssigenden, aëroben Sporenbildner aus der Gruppe des B. subtilis und mesentericus, die früher unter der Bezeichnung *Tyrothrix* als wichtige Reifungs-Erreger in den Lehrbüchern figurierten, sind jedenfalls nur von untergeordneter Bedeutung. Um sie im Käse aufzufinden, bedarf es oft eines besonderen Anreicherungs-

Digitized by Google

verfahrens: Nach § 32 entzuckerte Bouillon wird nach der Impfung mit Käse-Emulsion 5—10 Minuten bei 80° C pasteurisiert und später Fleischgelatine- und Fleischagar-Platten gegossen.

85. Sproßpilze. Während Hefezellen in den Hartkäsen meist nur in relativ sehr geringer Zahl vorzukommen pflegen, spielen sie fast in allen Weichkäsen eine mehr oder minder wichtige Rolle. Hefenreich sind besonders Gervais-, Imperial- und ähnliche Käse, die sich besonders gut als Ausgangs-Material für Sproßpilz-Studien eignen. In Cheddarkäse veranlassen Hefen nicht selten fehlerhafte Reifungserscheinungen.

Zur direkten Anfertigung elektiver Gußkulturen kann (nach L. Russell und Hastings) derart verfahren werden, daß man in einem Reagenzglas 1 g Weinsäure in 10 ccm Wasser löst, sterilisiert und davon (mittels steriler Pipette) je 1 ccm in die Petrischale überträgt. Das geimpfte Fleisch-Agar wird hinzugefügt und mit der Säure gut vermischt, die fast alle andern Keime unterdrückt. — Erscheint eine voraufgehende Anhäufung angezeigt, so sind die in § 70 enthaltenen Angaben sinngemäß anzuwenden.

Die Bestimmung der Käse-Hefen ist schwierig; eingehende vergleichende Untersuchungen fehlen. Außer dem in meinem „Handbuch der landw. Bakteriologie" hierüber Zusammengestellten vergl. eine später erschienene Arbeit von W. Dombrowski, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., 28, S. 345—402.

86. Schimmelpilze. Die besonders für Käse nach Brie-, Camembert- und Roquefort-Art wichtigen Schimmelpilze pflegen sich auf den gewöhnlichen Gußkulturen üppig zu entwickeln.

An Schimmelpilz-Sporen reiche Kulturgefäße dürfen nicht im Laboratorium geöffnet werden.

Digitized by Google

Für Spezialnährböden sind zahlreiche Rezepte aufgestellt worden, z. B.:

Brotbrei, hergestellt aus trockenem zerriebenen Brot, das man 1 cm hoch in Erlenmeyer-Kolben einfüllt, mit Wasser durchtränkt und im strömenden Dampf (durch dreimaliges Erhitzen) sterilisiert.

Reisbrei, bereitet aus 10 g Reismehl, 15 ccm Milch und 5 ccm Bouillon, wie Brotbrei sterilisiert.

Würze-Agar, erhalten durch Zusatz von $1^1/_2$ % Agar zu (nicht neutralisierter!) Bierwürze.

Pflaumendekokt-Gelatine, hergestellt aus 100 g getrockneten Pflaumen, die man zweimal mit je 100 ccm Wasser aufkocht; die vereinten 200 ccm Dekokt werden mit 10 % Gelatine versetzt, aber nicht neutralisiert.

Digitized by Google

C. Dünger-Bakteriologie

XXV. Keimgehalt des Düngers

87. Nährböden. Der Bestand an verfügbaren Reagenzgläsern ist auf 200 Stück zu ergänzen. Nach der in §§ 6—13 geschilderten Arbeitsweise sind fertigzustellen:

40 Glas Fleischgelatine	20 Glas Bouillon
40 Glas Fleischagar	20 Glas Milch
20 Glas Traubenzucker-Agar	20 Glas Kartoffeln

Ferner wird *Dünger-Extrakt* bereitet, indem ca. 150 g Stalldünger mit 300 ccm Wasser übergossen 24 Stunden aufbewahrt werden. Nach erfolgter Filtration (durch Papier-Faltenfilter) werden je 100 ccm mit 0,05% K_2HPO_4 und $1^1/_2$% Agar bzw. 10% Gelatine versetzt, nötigenfalls neutralisiert, mit Eiweiß geklärt und in Gläschen verteilt.

Der angegebene Vorrat an Nährböden reicht, abgesehen von Fleischgelatine und Fleischagar, für sämtliche in diesem Abschnitt angegebene Übungen, sofern nicht besonders ausführliche Untersuchungen damit verbunden werden.

Über die außerdem benötigten Nährsubstrate wird weiterhin das Erforderliche mitgeteilt werden.

88. Mikroskopische Untersuchungen. Von festen und flüssigen Exkrementen sowie von gemischtem Stalldünger sind (nötigenfalls nach gründlichem Verreiben mit wenig Wasser) Ausstrich-Präparate sowie Präparate im hängenden Tropfen anzufertigen und genau zu durchmustern. Die

Digitized by Google

festen Exkremente liefern besonders in ungefärbten, nach erfolgtem Antrocknen direkt in Balsam eingeschlossenen Ausstrichpräparaten sehr interessante Bilder (Abb. 38). Neben wenigen unverdauten Futterresten sieht man große, oft in Haufen zusammen gelagerte Massen von Bakterien der verschiedensten Form. In lebhafter Zersetzung begriffene Jauche gewährt namentlich im hängenden Tropfen Gelegenheit zu sehr abwechslungsreichen Beobachtungen. In zierlicher Schraubenbewegung befindliche (schwer züchtbare) Spirillen sind hier in der Regel gut zu sehen.

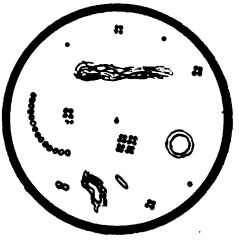


Abb. 38. Ungefärbtes Ausstrichpräparat von Rinder-Fäces. Vergr. 700.

Das gefärbte Ausstrichpräparat kann bei etwas modifizierter Art der Anfertigung (nach A. Klein) auch zu *mikroskopischen Zählungen* verwendet werden. 1 g feste Exkremente werden mit 4 ccm sterilisiertem Wasser im Reagenzglas kräftig durchgeschüttelt. $^1/_2$ ccm der Aufschwemmung wird in ein Uhrglas abpipettiert und $^1/_2$ ccm Anilinwasser-Viktoriablau (s. § 35) hinzugefügt. Nach gleichmäßiger Vermischung wird unter Benutzung einer Platinöse, deren Inhalt durch mehrmals wiederholte Wägungen vorher festgestellt wurde, ein bestimmtes Quantum entnommen und auf einen bestimmten Flächenraum des Objektträgers oder des Deckglases recht gleichmäßig ausgestrichen. Man läßt das Material antrocknen, fixiert und schließt (natürlich ohne abzuspülen!) in Balsam ein. Dann werden 50 Gesichtsfelder ausgezählt und nach Feststellung von deren Größe die erforderlichen Umrechnungen ausgeführt.

Trotz der selbstverständlich sehr weiten Fehlergrenzen gibt dieses Verfahren ein richtigeres Bild vom Keimgehalt der Exkremente, als dies für die Gußkulturen zutrifft. Unter Berücksichtigung der schwächeren Tingierbarkeit abgestorbener Bakterien kann man sich außerdem einen ungefähren Überblick über die auf die lebenden bezw. toten Keime entfallenden Anteile verschaffen.

Digitized by Google

Literatur: A. Klein, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., **27**, S. 834, Archiv f. Hygiene, **45**, 1902, S. 122 ff.

89. Aërobe und anaërobe Gußkulturen. In einem 2-Liter-Kolben wird 1 Liter und in 6 Reagenzgläsern je 9 ccm Leitungswasser sterilisiert. Ferner sind 8 1-ccm-Pipetten sowie 6 Burri-Röhren (im Autoklav oder im Dampftopf) und 12 leere sowie 2 mit (nach § 75 hergestellten) Filtrierpapier-Scheiben gefüllte Petrischalen im Trockenschrank zu sterilisieren. Nach erfolgter Abkühlung werden je 3 Gläschen Fleisch- und Düngerextrakt-Gelatine sowie je 6 Gläschen Fleisch- und Düngerextrakt-Agar in geschmolzenem Zustande (in richtig temperiertem Wasser) zurechtgestellt. Dann wird 1 g Substanz (nach § 75) abgewogen und in dem einen Liter sterilisierten Wassers durch mehrere Minuten anhaltendes Schütteln gründlich verteilt. Nach jedesmaligem kräftigen[1]) Durchschütteln werden unter Übertragung von je 1 ccm die erforderlichen Verdünnungen in 5 Reagenzgläsern hergestellt (vergl. § 20). Gleichzeitig bringt man je 1 ccm aus dem 3. bis 5. Glase (entsprechend $^1/_{1\,000\,000}$ bis $^1/_{100\,000\,000}$ g) in die (genau bezeichneten) Schalen und impft in anologer Weise je 3 Fleischagar- und Düngerextrakt-Agar-Röhrchen für die Anaëroben-Kultur. Die Gußkulturen werden in bekannter Weise (§§ 17, 20 und 34) hergestellt, aufbewahrt und ausgezählt. Die ermittelte Zahl bleibt in der Regel weit hinter derjenigen der wirklich vorhandenen lebenden Keime zurück, von denen in 1 g festen Exkrementen etwa 2—20 Milliarden zugegen sein mögen.

---

[1]) Wie das mikroskopische Präparat erkennen läßt, hängen die Keime oft zu mehreren zusammen; nur durch starke Bewegung können sie getrennt werden. Unterbleibt dies, so entstehen Mischkolonien.

Digitized by Google

Die am häufigsten vorkommenden Keime sind abzuimpfen, durch erneutes Plattengießen zu reinigen (vergl. § 21) und in bekannter Weise zu untersuchen (Kap. V—VIII).

90. Gewichtsanalytische Bestimmung der vorhandenen Mikroorganismen. Annähernd richtige Anhaltspunkte über die in den festen Exkrementen vorhandenen (lebenden und toten) Keim-Mengen können auch dadurch gewonnen werden, daß man (nach J. Strasburger) durch Zentrifugieren Kotbestandteile und Bakterien trennt. Das (besonders an menschlichen Fäzes oft erprobte und modifizierte) Verfahren wird folgendermaßen ausgeführt: 2 ccm Kot werden in der Reibschale mit 70 ccm $^1/_2$-proz. Salzsäure verrieben und in zwei Portionen (zu je 35 ccm) ca. 5 Minuten rasch (ca. 2000 Touren pro Minute) zentrifugiert. Die Flüssigkeit wird abgesaugt, mit zwei Teilen 96-proz. Alkohol versetzt und 12—15 Stunden bei 38° C aufbewahrt. Den hieraus durch Zentrifugieren gewonnenen Absatz wäscht man mit Alkohol aus, schwemmt in Äther auf und läßt einen Tag lang (unter wiederholtem Umschwenken) stehen. Dann wird wieder abgesaugt, Alkohol zugegeben, zentrifugiert und der Rückstand einen Tag unter Pepsin-Salzsäure aufbewahrt. Den nach Verdünnung der Flüssigkeit mit zwei Teilen Alkohol durch erneutes Zentrifugieren gewonnenen Absatz spült man (mittels Alkohol) in ein Porzellanschälchen, trocknet und wägt.

Literatur: Strasburger, Zeitschr. f. klin. Medizin, **46**, 1902, S. 418; Ermann, Über eine Methode zur Feststellung der in den Fäzes enth. Bakt. Diss. med. Bonn, 1902; Ehrenpfordt, Zeitschr. f. experim. Pathologie, 7, 1909, S. 455.

XXVI. Anaërobe Pektin- und Zellulose-Zersetzung [1])

91. Anaërobe Pektinzersetzung. Zur Anhäufung der aktiven Organismen (aus der Gruppe des Bac. amylobacter) kann folgende Lösung benutzt werden:

---

[1]) Über aërobe Pektin- und Zellulose-Zersetzung wird im XXXIII. Kapitel gesprochen werden.

Digitized by Google

100 Leitungswasser	0,05 K_2HPO_4
0,05 $(NH_4)_2SO_4$	2 $CaCO_3$

Davon sind je ca. 20 ccm in 3—4 Reagenzgläser zu füllen, in die vorher je 0,1 g Pektin[1]) gegeben wurde. Nach dem Sterilisieren (im strömenden Dampf) wird ein Gläschen mit wenig gerottetem Stallmist geimpft und bei 38° C bebrütet. Nachdem kräftige Gasentwicklung eingetreten ist (nach 4—8 Tagen), wird in ein zweites Glas übergeimpft und eventuell von hier aus durch nochmalige Übertragung weiter gereinigt.

Die Pektinzersetzer sind eingehend mikroskopisch (am besten im Tusche-Ausstrichpräparat) zu prüfen. Auf Agar, das unter Verwendung von verdünnter, schwach saurer Bierwürze herzustellen ist, können sie (in den Burri-Röhren) isoliert werden.

92. Anaërobe Zellulose-Zersetzung. Die bisher am besten bekannten anaëroben Zellulose-Zersetzer sind die von Omelianski eingehend studierten Wasserstoff- und Methan-Bazillen. Zur Anhäufung dient folgende Lösung:

100 destill. Wasser	0,05 $MgSO_4$
0,1 $(NH_4)_2SO_4$	Spur NaCl
0,1 K_2HPO_4	2 $CaCO_3$

[1]) Das Pektin wird am besten (nach Behrens und Störmer) in folgender Weise gewonnen: 500 g zerriebene Rüben oder Möhren werden zunächst mit heißem chloroformhaltigen Wasser mehrfach ausgelaugt. Dann wird $^1/_2$ Stunde (ohne Erwärmen) mit verdünnter Natronlauge behandelt, mit Wasser nachgewaschen, $^1/_2$ Stunde mit verdünnter Salzsäure extrahiert und wieder mit Wasser nachgewaschen. Schließlich werden die Pektinsubstanzen mit verdünntem Ammoniakwasser gelöst und aus der ammoniakalischen Lösung durch Zugabe von $^1/_2$proz. Chlorcalcium-Lösung die Pektin-Gallerte gefällt, die mit viel destilliertem Wasser, zuletzt auf dem Filter auszuwaschen ist. Aus Flachs, Hanf, Stroh usw. kann dasselbe Präparat, aber nur in relativ geringen Mengen gewonnen werden.

Digitized by Google

Einige Gläser werden mit je ca. 20 ccm der Lösung gefüllt, ca. 0,1 g Filtrierpapier, Watte oder Stroh hinzugefügt, reichlich mit gerottetem Stallmist geimpft und bei 38° C aufbewahrt.

Zur Anhäufung des *Methanbazillus* wird jedesmal bei beginnender Gärung (ohne Pasteurisierung) in die gleiche Lösung übergeimpft. Der *Wasserstoffbazillus* wird dagegen erhalten, wenn vor der jedesmaligen Übertragung durch Pasteurisieren die zu dieser Zeit in vegetativer Form vorhandenen Methanbazillen abgetötet und so die gleichzeitig im Sporenzustande anwesenden Wasserstoff-Bazillen ausgelesen werden.

Die Kultivierung dieser anaëroben Zellulose-Zersetzer auf festen Substraten ist bisher nur in Ausnahmefällen gelungen.

Literatur: Omelianski, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., 8, spez. S. 226 f., 263, 290 f., 355 f., und **11**, S. 369. Wegen anderer Zellulose-Zersetzer s. Löhnis, Handbuch d. landw. Bakteriologie.

XXVII. Bildung von Gasen. Thermophile Bakterien.

93. Bildung von Methan[1]**).** Neben der Vergärung der Zellulose kann das in den Düngergasen vorkommende Methan auch der Zersetzung von *Salzen organischer Säuren*, von *Gummi, Stärke* und *Zucker* sowie von *Eiweißsubstanzen* seine Existenz verdanken. Zur Einleitung des Prozesses können folgende Lösungen benutzt werden:

100 Leitungswasser
0,05 NH_4Cl
0,05 K_2HPO_4
} + 1% {Acetat oder Butyrat oder Laktat usw., bezw. Gummi oder Stärke oder Zucker, bezw. Pepton oder Wolle.

Die Substrate sind in Reagenzgläser zu verteilen, reichlich mit gerottetem Mist zu impfen und bei 38° C zu halten.

[1]) Eventuell können mit den Versuchen über die Bildung von CH_4 und H Experimente über die Verarbeitung dieser Gase durch Mikroorganismen verbunden werden; vergl. Kap. XXXIV.

Digitized by Google

Die aktiven Organismen sind noch nicht näher studiert worden. Tusche-Ausstrichpräparate liefern sehr interessante Bilder.

Literatur: Mazé, Compt. rend. (Paris), **137**, S. 887; Omelianski, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **15**, S. 679; Söhngen, Proefschrift Delft, 1906, ref. Botan. Centralbl., **105**, S. 371.

94. Bildung von Wasserstoff[1]. Wie das Sumpfgas kann auch der im Dünger auftretende Wasserstoff anderen Quellen als der Zellulose-Zersetzung entstammen. Die im rottenden Mist in großer Zahl vorkommenden Formen aus der Gruppe des Aërobacter und Amylobacter können sowohl aus Salzen organischer Säuren, Stärke und Zuckerarten, wie aus stickstoffhaltigen Stoffen (neben CO_2) mehr oder minder große H-Mengen in Freiheit setzen. Eine mit besonderem Namen (Bact. formicicum) belegte, Formiat unter Wasserstoff-Entwicklung vergärende Coli-Varietät kann z. B. in nachstehender Lösung angehäuft werden:

Leitungswasser + 0,2 % Pepton + 2 % Calcium-Formiat verteilt in Reagenzgläser, geimpft mit Dünger, einige Tage bei 38° C kultiviert.

Literatur: Omelianski, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **11**, S. 177, 256, 317 und **14**, S. 674.

95. Kohlensäure-Produktion. Noch zahlreicher als die von den verschiedenen Methan- und Wasserstoff-Bildnern zersetzten Substanzen sind die unter Kohlensäure-Entwicklung von der großen Schar von Dünger-Organismen veratmeten Stoffe. Von der Intensität der Umsetzung kann man sich ohne weiteres überzeugen, wenn man einen Strom kohlensäurefreier Luft eine mit doppelt durchbohrtem Stopfen verschlossene, mit Mist gefüllte Flasche und danach eine geeignete Auffangvorrichtung passieren läßt (zur Demonstration: Röhre mit Barytlauge; zur quantitativen Bestimmung: Kaliapparat nach Liebig).

96. Thermophile Bakterien. Infolge der besonders in den ersten Wochen sehr lebhaften Zersetzungsvorgänge überschreitet die Temperatur des Düngerhaufens nicht selten 45—50° C, d. h. jene

[1]) S. Anm. auf S. 109.

Digitized by Google

Grenze, oberhalb deren nur noch thermophile Bakterien tätig sein können. Diese können isoliert werden, indem man zunächst mit Mist geimpfte Bouillon bei 50—60° C aufbewahrt und die hierin zur Entwicklung kommenden Keime mittels Agar-Gußkulturen (bei gleicher Temperatur) züchtet.

XXVIII. Harnstoff-, Hippursäure- und Harnsäure-Bakterien

97. Harnstoff-Bakterien. 500 ccm Fleischbouillon sind zu bereiten und davon 400 ccm zur Herstellung von 200 ccm Fleischgelatine (mit 12 statt 10% Gelatine-Zusatz) und 200 ccm Fleisch-Agar zu verwenden. Von den restierenden 100 ccm Bouillon erhalten 50 ccm einen Zusatz von 2%, die andern 50 dagegen 10% Harnstoff. Die 2- bezw. 10-proz. Harnstoff-Bouillon ist in je 6 Reagenzgläser zu verteilen. Gelatine und Agar genügen zur Füllung von je ca. 24 Gläschen. Nachdem in gewohnter Weise sterilisiert worden ist, wird 18 Gelatine- und 12 Agar-Gläschen je 1 ccm einer 15-proz. wässerigen Harnstofflösung hinzugefügt und noch einmal im strömenden Dampfe erhitzt.

Der Harnstoffzusatz vermindert die Erstarrungsfähigkeit der Gelatine, deshalb wird er zweckmäßig erst vor dem letzten Sterilisieren hinzugefügt. Im strömenden Dampf wird ein relativ kleiner Teil des Harnstoffs in Ammoniak übergeführt, was auf den Verlauf des Versuches ohne erheblichen Einfluß ist. Mit gespanntem Dampf dürfen Harnstoff-haltige Nährböden selbstverständlich nicht behandelt werden. — Die nicht mit Harnstoff versetzten Gelatine- und Agarröhrchen dienen zur Ergänzung des Bestandes.

Ein Gläschen mit 2-proz. Harnstoff-Bouillon wird nach erfolgter Impfung mit Mist oder Jauche bei ca. 10° C aufbewahrt; verschiedene Kurzstäbchen und Mikrokokken kommen zur Entwicklung. Ein Gläschen mit 10-proz. Harnstoff-Bouillon ist nach Impfung mit dem gleichen

Digitized by Google

Material bei 38° C zu halten; nach 2—4 Tagen ist starker Ammoniakgeruch wahrnehmbar, schlanke sporenbildende Bakterien sind in der nur schwach getrübten Flüssigkeit sichtbar.

Aus den beiden Gläschen ist, sobald deutlicher Ammoniak-Geruch auftritt, in die entsprechende Lösung überzuimpfen und unter gleichen Bedingungen zu kultivieren. Die Gußkulturen aus der kalt gehaltenen 2-proz. Harnstoff-Bouillon können unter Verwendung von Harnstoff-Gelatine angefertigt werden; für die 10-proz. Harnstoff-Bouillon kann Harnstoff-Agar Verwendung finden. Nach erfolgter Reinigung sind die isolierten Stämme außer auf Harnstoff-Agar, Harnstoff-Gelatine und Harnstoff-Bouillon auch auf den sechs Standard-Nährböden zu prüfen, auf denen speziell die aus der 10-proz. Harnstoff-Bouillon isolierten Formen fast niemals, die aus der 2-proz. Lösung ziemlich oft nicht wachsen. Der häufigste Sporenbildner in der 10-proz. Lösung ist der Bacillus Pasteurii; in den verdünnteren Lösungen sind Fluoreszenten, Mikrokokken, verschiedene Varietäten von Bact. coli, vulgare, erythrogenes u. a. anzutreffen.

In den harnstoffhaltigen Nährböden sind Kristallbildungen nicht selten; doch treten sie keineswegs so regelmäßig auf, daß sie als Erkennungsmerkmal harnstoffspaltender Bakterien verwendbar wären.

Literatur über Harnstoffbakterien: Beijerinck, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., 7, S. 33. Weitere Angaben über andere, besonders zur Anhäufung harnstoffzersetzender Arten aus Erde geeignete Nährlösungen folgen in § 119.

98. Hippursäure-Bakterien. 100 ccm Leitungswasser + 0,3 g hippursaurem Natron + 0,05 g K_2HPO_4 werden zu je 10 ccm in kleine Erlenmeyer-Kolben gefüllt und mit Mist oder Jauche geimpft. Die Zersetzung verläuft ziemlich langsam. Mikrokokken, verschiedene Kurzstäbchen (Bact. prodigiosum, vulgare u. a.) sowie Schimmelpilze treten in Tätigkeit.

Digitized by Google

99. Harnsäure-Bakterien. 100 ccm Leitungswasser + 0,3 g Harnsäure + 0,05 g K_2HPO_4 werden zu je 10 ccm in kleine Erlenmeyer-Kolben gefüllt und mit Mist oder Jauche geimpft. Fluoreszenten und andere Stäbchen sowie Schimmelpilze können sich an der Zersetzung beteiligen. Der intermediär gebildete Harnstoff wird nicht immer von demselben Organismus weiterzersetzt. Zur Isolierung kann Fleischgelatine benutzt werden.

XXIX. Nitrifikation. Denitrifikation. Nitratreduktion

100. Nitrifikation. Nur in der oberen Schicht des Hofdüngers und am Boden des Flachstalles pflegen die Salpeterbakterien in größerer Zahl vorzukommen. Dagegen verhindern in der Regel Luftmangel und Anwesenheit freien Ammoniaks im Tiefstalldünger wie in den tieferen Schichten des auf der Düngerstätte lagernden Mistes eine nennenswerte Vermehrung dieser Organismen. Die Hauptstätte der Nitrifikation ist die Ackererde.

Bei Zimmertemperatur pflegt der Nitrifikations-Versuch 3—4 Wochen in Anspruch zu nehmen. Es erscheint deshalb zweckmäßig, die nachstehend angegebenen 3 Lösungen sowohl mit geeignetem Stallmist wie auch gleichzeitig mit Erde zu impfen. Isolierungsversuche können später (§ 121) unter Verwendung dieser Anhäufungskulturen vorgenommen werden. Durch Kultivieren bei 25—30° C kann der Verlauf der Umsetzung nötigenfalls beschleunigt werden.

Die erste der drei nachstehend aufgeführten Lösungen läßt vornehmlich die Nitritbildner, Lösung II die Nitratbildner und Lösung III gleichzeitig (wie im natürlichen Substrat) Nitrit- und Nitratbildner zur Entwicklung kommen.

Digitized by Google

I		II	III
100,00 dest. Wasser	dazu nach d.	100,00 dest. Wasser	Dieselbe Lösung wie I.
0,10 $(NH_4)_2SO_4$	Sterilisieren	0,10 $NaNO_3$	Doch wird an Stelle
0,10 K_2HPO_4	basisches	0,05 K_2HPO_4	des Magnesiumkarbo-
0,05 $MgSO_4$	Magnesium-	0,03 $MgSO_4$	nats nach dem Sterili-
0,20 NaCl	karbonat im	0,05 NaCl	sieren $CaCO_3$ hinzu-
0,04 $FeSO_4$	Überschuß	0,03 Na_2CO_3	gefügt.

Portioniert wird zu je 10 ccm in 50 ccm-Erlenmeyer-Kolben; zur Impfung dient einerseits eine kleine Quantität, ca. $^1/_{10}$ g Dünger entsprechender wässeriger Mistauszug, andrerseits $^1/_{10}$ g fruchtbare Erde. Nach Verlauf von etwa 8—14 Tagen kann man damit beginnen, aller 2—3 Tage von der (klarbleibenden!) Flüssigkeit mit der sterilisierten Öse eine geringe Menge für eine Tüpfelreaktion (auf dem Porzellanteller) zu entnehmen. Mit Neßlers Reagens wird auf das Verschwinden des Ammoniaks, mit Sulfanilsäure-Naphtylamin auf Entstehen bezw. Verschwinden des Nitrits geprüft. Die Nitrat-Endreaktion kann mit Diphenylamin-Schwefelsäure nachgewiesen werden.

Das Nitrit-Reagens wird zweckmäßig nach folgendem Rezept bereitet: 0,5 g Sulfanilsäure werden in 150 ccm 33-proz. Essigsäure gelöst, desgleichen 0,1 g α-Naphtylamin unter Erwärmen in 20 ccm Wasser. Der zweiten Lösung werden ebenfalls 150 ccm 33-proz. Essigsäure hinzugefügt, dann beide Lösungen vereinigt und in luftdicht schließender Flasche aufbewahrt. Noch 0,0002 mg Nitrit werden durch rötliche Färbung angezeigt.

101. Denitrifikation. Die am häufigsten benutzten[1]) elektiven Nährsubstrate sind *Salpeterbouillon* und sog. *Giltay-Lösung*. Jene wird bereitet, indem man einigen (etwa 6) Bouillongläschen je 1 ccm einer 1-proz. Salpeterlösung (entsprechend ca. 0,1 %) hinzufügt und nochmals sterilisiert.

[1]) Weitere Rezepte folgen in § 122.

Digitized by Google

Den gleichen Zusatz erhalten 10 Fleischagar-Röhrchen. Für die Bereitung der Giltay-Lösung gilt nachstehende Vorschrift:

0,2 g KNO_3 0,1 g Asparagin	gelöst in 25 ccm destill. Wasser	Beide Lösungen werden vereinigt und auf 100 ccm aufgefüllt.
0,5 g Zitronensäure 0,2 g KH_2PO_4 0,2 g $MgSO_4$ 0,02 g $CaCl_2$ Spur Fe_2Cl_6	gelöst in 50 ccm destill. Wasser, neutralisiert mit Kalilauge	

35 ccm werden auf 4 Reagenzgläser verteilt; der Rest wird mit $1^1/_2$ % Agar versetzt, nach erfolgter Filtration ebenfalls auf Gläser gefüllt und sterilisiert.

Je ein Glas beider Lösungen wird mit $^1/_4$—$^1/_2$ g rottendem Mist geimpft; nachdem (in 2—3 Tagen bei 38° C) Schaumbildung eingetreten ist, wird in die entsprechende Lösung noch ein- oder zweimal abgeimpft und dann Gußkulturen mit Salpeter-Fleischagar bezw. mit Giltay-Agar derart angefertigt, daß man nach dem Festwerden des geimpften Agars jedesmal noch ein Gläschen als Deckschicht entleert. Nach einigen Tagen (bei 38° C) machen sich die denitrifizierenden Kolonien durch Gasbildung bemerklich. Sie können auf den Standard-Nährböden weiter gezüchtet werden.

Strohabkochung + 0,1 % Salpeter pflegt nach Impfung mit Mist gleichfalls kräftige Denitrifikation zu liefern.

Die in Giltay-Lösung entstehenden Kristalle sind Magnesium-Phosphat (vergl. Hutchinson, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **16**, S. 326).

102. Nitratreduktion. In der Salpeterbouillon pflegen neben denitrifizierenden auch nitratreduzierende und salpeterassimilierende Bakterien häufig aufzutreten, die mitunter die Denitrifikation sogar vollständig unterdrücken. Wegen der die Reduktion anzeigenden Nitrit-Reaktion s. oben (§ 100); betr. Salpeterassimilation vergl. § 105.

Digitized by Google

Die Kolonien der nitratreduzierenden Keime können nach Beijerinck (Centralbl. f. Bakt., II. Abt., 1, S. 58) auf der Salpeter-Fleischagar-Platte erkannt werden, wenn man dem Agar bei der Darstellung außer Salpeter noch 0,5 % Stärke hinzufügt und die entwickelte Gußkultur zur Hälfte mit salzsaurer Jodkalium-Lösung befeuchtet. Die reduzierenden Kolonien erhalten einen blauen Hof. Da die Salzsäure die Bakterien tötet, müssen auf der nicht befeuchteten Platten-Hälfte die entsprechenden Kolonien abgeimpft werden.

XXX. Amid-, Ammon- und Salpeter-Assimilation

103. Amid-Assimilation. Als Stammlösung ist folgende Mischung fertigzustellen:

1000 ccm destill. Wasser	0,02 g NaCl
0,5 g K_2HPO_4	Spur Fe_2Cl_6
0,02 g $MgSO_4$	

Hiervon werden je 100 ccm mit 1 % Traubenzucker und 0,1 % einer der folgenden Stickstoffquellen versetzt: Harnstoff, hippursaures Natron, Harnsäure oder Asparagin. Je 4×10 ccm verteilt man in 50 ccm-Erlenmeyer-Kolben und impft jedesmal 1 Kolben mit Dünger, 1 mit Erde. Der Rest der Lösungen wird mit $1\frac{1}{2}$ % Agar versetzt und zur ersten Isolierung verwendet. Zur Fortzüchtung können meist die Standard-Nährböden gebraucht werden. Die geimpften Flüssigkeiten sind in der Regel schon nach wenigen Tagen von einer kräftigen Haut überzogen. Sehr verschiedene sporenbildende und sporenfreie Bakterien (Bac. pumilus, Bact. fluorescens, radiobacter, aërogenes, erythrogenes u. a.) sowie Pilze können den Amidstickstoff assimilieren.

Statt Traubenzucker können zahlreiche andere C-Quellen Verwendung finden (z. B. Rohrzucker, Glyzerin, Mannit, Calciumlaktat usw.), die entsprechende Änderungen in der Mikroflora hervorrufen.

Digitized by Google

Die „eiweißschützende" Wirkung, die manche Amidsubstanzen des Futters beim Verdauungsprozeß ausüben, kann für solche Amidassimilanten, die Kaseïn auflösen, in der Weise demonstriert werden, daß man Strichkulturen der betreffenden Arten sowohl auf Milchagar (§ 63) wie auf mit 0,1 % Asparagin versetztem Milchagar anlegt. In jenem Falle findet Aufhellung statt, in diesem dagegen nicht.

104. Ammon-Assimilation. Je 100 ccm der oben (§ 103) angegebenen Stammlösung werden mit 1 % Traubenzucker sowie mit 0,1 % einer der folgenden Stickstoffquellen versetzt: Ammonsulfat, Ammonacetat, Ammonbutyrat oder Ammonlaktat. Im übrigen findet das in § 103 Gesagte sinngemäße Anwendung.

Verwendung verschiedener C-Quellen liefert hier gleichfalls eine große Zahl von Variationen in der Versuchsanstellung und in den Ergebnissen.

105. Salpeter-Assimilation. Je 100 ccm der oben (§ 103) angegebenen Stammlösung werden mit 0,1 % Natriumnitrat sowie mit 1 % Traubenzucker bezw. Glyzerin versetzt. Weiter ist nach § 103 zu verfahren. Traubenzucker pflegt fast nur Schimmelpilze, Glyzerin verschiedene (gewöhnlich auch einige denitrifizierende) Bakterien zur Entwicklung kommen zu lassen.

Literatur zu §§ 103—105: Bierema, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **23**, S. 672 (ausführliche Prüfung einer großen Zahl von N- und C-Quellen sowie zahlreicher Reinkulturen assimilierender Organismen).

Digitized by Google

D. Boden-Bakteriologie

XXXI. Keimgehalt des Bodens

106. Nährböden. Der Bestand an verfügbaren Reagenzgläsern ist auf 250 Stück zu ergänzen. Nach der in §§ 6—13 geschilderten Arbeitsweise sind (unter Verwendung von 1500 ccm Bouillon) fertigzustellen:

70 Glas Fleischgelatine	30 Glas Bouillon
30 Glas Fleischagar	30 Glas Milch
30 Glas Traubenzucker-Agar	30 Glas Kartoffeln

Die restierende Bouillon wird in einem passenden Kolben sterilisiert und für später zurückgestellt.

Ferner wird *Bodenextrakt* in folgender Weise bereitet: 1 kg gute, fruchtbare Gartenerde wird entweder mit 1 L Leitungswasser $^1/_2$ Stunde im Autoklav bei einer Atmosphäre Überdruck gehalten, oder sie wird mit 2 L Leitungswasser 2 Stunden über offener Flamme gekocht. Dann wird die trübe Flüssigkeit abgegossen, mit etwas Talk verrührt und durch ein festes (doppeltes) Papier-Faltenfilter filtriert. Der zuerst durchlaufende, noch trübe Anteil ist auf das Filter zurückzugeben. 1 kg Erde liefert ca. 800 ccm Extrakt; falls zu stark eingedampft wurde, ist auf 800 ccm aufzufüllen. Dem Extrakt sind 0,05 % K_2HPO_4 hinzuzufügen. Von dieser Stammlösung werden je 100 ccm (in analoger Weise wie Bouillon) zu *Bodenextrakt-Gelatine* und *Bodenextrakt-Agar* (je 10—12 Gläschen) verarbeitet. Der Rest wird im Literkolben sterilisiert und für später reserviert.

Digitized by Google

Der angegebene Vorrat an Nährböden reicht, abgesehen von Fleischgelatine und Fleischagar für sämtliche in diesem Abschnitt angegebene Übungen, sofern nicht besonders ausführliche Untersuchungen damit verbunden werden. — Über die außerdem benötigten Nährsubstrate wird weiterhin das Erforderliche mitgeteilt werden.

107. Keimgehalt des Bodens. Über das relativ spärliche Vorkommen von Bakterien im Boden kann man sich direkt durch Betrachtung eines mit ein wenig Erdaufschwemmung hergestellten Tusche-Ausstrichpräparates (§ 24) unterrichten. Zur Anfertigung von Gußkulturen sterilisiert man zunächst 1000 ccm Leitungswasser im 2-Liter-Kolben, fünf Reagenzgläser mit je 9 ccm Wasser sowie sechs 1-ccm-Pipetten (im Autoklav oder im Dampftopf) und zwölf leere, sowie nötigenfalls (vergl. § 75) zwei mit Filtrierpapier-Scheiben gefüllte Petrischalen (im Trockenschrank). Nach erfolgter Abkühlung sind je drei Gläschen Fleischgelatine, Bodenextrakt-Gelatine, Fleischagar und Bodenextrakt-Agar in geschmolzenem Zustande (in richtig temperiertem Wasser) zurechtzustellen. Dann wird 1 g der zu prüfenden Erde (nach § 75) abgewogen und in dem einen Liter sterilisierten Wassers durch mehrere Minuten fortgesetztes Schütteln gründlich verteilt. Nach jedesmaligem kräftigen Durchschütteln werden fortlaufend mit je 1 ccm die erforderlichen Verdünnungen in den Reagenzgläsern hergestellt (§ 20), je nach dem zu erwartenden Keimgehalt der betreffenden Erde $^1/_{10\,000}$ bis $^1/_{1\,000\,000}$ oder $^1/_{100\,000}$ bis $^1/_{10\,000\,000}$ g in die entsprechend bezeichneten Schalen gebracht und hier mit den verschiedenen Nährsubstraten sorgfältig vermischt. Die Gußkulturen werden in bekannter Weise (vergl. §§ 17 und 34) aufbewahrt und ausgezählt. Die am häufigsten vorkommenden Keime (von jedem Substrat etwa ein bis zwei Stämme) sind abzuimpfen, durch erneutes Plattengießen unter Benutzung

Digitized by Google

der entsprechenden Substrate zu reinigen (§ 21) und in bekannter Weise zu untersuchen (Kap. V—VIII).

In Erde von mäßiger Fruchtbarkeit pflegt der Keimgehalt (nach den Ergebnissen der Plattenzählung) zwischen 100000 und 10 Millionen, in reicherem Boden zwischen 1 und 100 Millionen (pro g) zu schwanken. Bei genaueren vergleichenden Untersuchungen müssen selbstverständlich die Proben in übereinstimmender Weise (z. B. mittels eines sauberen Löffels aus der mit dem Spaten glatt abgestochenen Seitenwand einer kleinen Grube, 8—12 cm unter der Oberfläche) entnommen und die Ergebnisse durch Parallel-Versuche gesichert werden. Die Fehlergrenzen bei derartigen Versuchen sind groß; mit Rücksicht auf den nur generell orientierenden Charakter derartiger Untersuchungen hat dies jedoch nicht allzu viel auf sich.

Höhere, aber noch ungenauere Zahlen erhält man, wenn man die in den folgenden Kapiteln für die verschiedenen Umsetzungen angegebenen Spezial-Nährlösungen in kleinen Quantitäten in geeignete Gefäße verteilt, mit etwas sterilisierter Erde versetzt und nach erfolgter Sterilisation mit den verschiedenen Verdünnungen impft, die hierzu noch weiter fortgesetzt werden müssen, als oben angegeben wurde. Um einigermaßen zuverlässige Resultate zu erhalten, müssen zu derartigen Versuchen stets wenigstens 4 Parallelreihen in Gang gebracht werden.

108. Katalase-Probe. Ähnlich wie die Milch (vergl. § 53) zersetzt auch die Erde Wasserstoffsuperoxyd; die abgespaltenen Sauerstoff-Mengen sind in diesem Falle aber weit größer als in jenem. Humus, Mikroorganismen und anorganische Bodenbestandteile beteiligen sich gemeinsam an dem Prozeß. In der Regel genügt es, 5 g Erde mit 20 ccm 3proz. Wasserstoffsuperoxyd (1 Teil Perhydrol Merck + 9 Teile destill. Wasser) zu versetzen; sehr humusreichen Böden (Schwarzerden) muß dagegen 40 ccm hinzugefügt werden, wenn die volle Sauerstoff-Entwicklung beobachtet werden soll. Für Vergleichszwecke scheint es am zweckmäßigsten zu sein, festzustellen, innerhalb welcher Zeit die ersten 100 ccm Sauerstoff in Freiheit gesetzt werden. Die im 300-ccm-Erlenmeyer-Kolben befindliche Erde wird zweckmäßig vor Zugabe des Wasserstoffsuperoxyds in 50 ccm Wasser aufgeschwemmt, das Gemisch

Digitized by Google

während der Beobachtungszeit in Bewegung gehalten und das Gas in einem graduierten Rohr über Wasser aufgefangen. Experimentiert man mit derselben Erde 1. in frischem Zustande, 2. nach erfolgter Abtötung der Mikroorganismen und Zerstörung von deren Katalase durch Behandlung der Erde im Autoklaven bei 2 Atm. Überdruck und 3. nach Zerstörung der Humusubstanzen durch Glühen des Bodens, so erhält man ein ungefähres Urteil über die Beteiligung der drei genannten Faktoren am Resultat.

XXXII. Kohlensäure-Produktion Gärungs-Intensität

109. Kohlensäure-Produktion. Ähnlich wie im Stalldünger kann man sich über die Atmungs-Intensität der Gesamtheit der Bodenorganismen, zugleich natürlich auch über die Zersetzlichkeit des Humus in der betreffenden Erde annähernd orientieren, wenn man aus der in Flaschen gefüllten Erde die Kohlensäure in geeignete Auffanggefäße leitet (vergl. § 95). Will man den natürlichen Verhältnissen möglichst nahekommen, so kann man mittels weiter Blechzylinder die erforderlichen Proben aus dem gewachsenen Erdreich herausbohren und nach zweckentsprechendem Verschluß der Behälter die Kohlensäure-Produktion der in ihrer ursprünglichen Lage erhaltenen Erde studieren.

Literatur: Hesselink van Suchtelen, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **28**, S. 45.

110. Gärungs-Intensität. Impft man eine wässerige Zuckerlösung (z. B. Leitungswasser + 4 % Traubenzucker + 0,1 % Pepton + 0,05 % K_2HPO_4) mit 10 Prozent Erde, so veranlassen zahlreiche Bakterien besonders aus der Gruppe des Aërobacter und Amylobacter eine meist recht lebhafte Entwicklung von Kohlensäure und Wasserstoff. Durch Wägung der Versuchsgefäße zu Beginn und am Ende wird die Größe des Gasverlustes festgestellt.

Literatur: R. Albert und Luther, Journal f. Landwirtschaft, **56**, 1908, S. 361 ff.

Digitized by Google

XXXIII. Aërobe Pektin- und Zellulose-Zersetzung[1])

111. Aërobe Pektin-Zersetzung. Von der in § 91 angegebenen Lösung sind je 10 ccm in drei bis vier 50-ccm-Erlenmeyer-Kolben zu verteilen. Ein Kolben wird mit Erde geimpft; nach ca. acht Tagen bei 25° C kann die Reinigung durch fortlaufende Übertragungen in die anderen Kolben erfolgen. Die Anhäufungen sind mikroskopisch (im Tusche-Ausstrichpräparat) zu prüfen. Zur Isolierung dient Fleischgelatine. Neben verschiedenen Schimmelpilzen sind besonders einige sporenbildende Bakterien (B. asterosporus sowie Subtilis- und Mesentericus-Varietäten) an der aëroben Pektin-Zersetzung beteiligt. Die häufigsten Arten (etwa drei) sind abzuimpfen und zu diagnostizieren.

112. Aërobe Zellulose-Zersetzung. In zwei Petrischalen werden je zwei Scheiben Filtrierpapier gelegt. In der einen Schale wird zwischen das Papier $MgNH_4PO_4$ gestreut, mit 0,05 proz. wässeriger K_2HPO_4 Lösung befeuchtet, mit humusreicher Erde geimpft und bei 25—30° C kultiviert. Nach 3—6 Tagen erscheinen braune, durch Bakterien gebildete Flecke.

In der anderen Schale wird das Papier mit derselben Erde geimpft, aber mit folgender Lösung befeuchtet: 100 Leitungswasser, 0,05 NH_4NO_3, 0,05 K_2HPO_4. Kultiviert wird in diesem Falle bei Zimmertemperatur; von Zeit zu Zeit ist von neuem anzufeuchten. Nach zwei bis drei Wochen wachsen verschiedene zellulosezersetzende Schimmelpilze.

Der Verlauf der Organismen-Entwicklung ist eingehend mikroskopisch zu verfolgen. Über Reinkulturen der aëroben Zellulose-Bakterien ist bisher nichts Näheres bekannt geworden. Die Schimmelpilze können in der allgemein üb-

[1]) Wegen der im Boden ebenfalls vorkommenden anaëroben Pektin- und Zellulose-Zersetzung vergl. Kap. XXVI.

Digitized by Google

lichen Weise isoliert und fortgezüchtet werden (vergl. auch § 86).

Wegen Zellulose-Zersetzung durch denitrifizierende Bakterien s. § 122.

XXXIV. Verarbeitung von Methan, Wasserstoff und Kohlenoxyd[1])

113. Verarbeitung von Methan. Zur Anhäufung dient folgende Lösung (nach Söhngen): 100 destill. Wasser, 0,1 $MgNH_4PO_4$, 0,05 K_2HPO_4, 0,01 $CaSO_4$, in flacher Schicht im Erlenmeyer-Kolben. Nach Einimpfung von mit Stallmist gedüngter Erde, Jauche oder Grabenwasser wird in dem mit geeignetem Verschluß (z. B. mit doppelt durchbohrtem Stopfen mit zwei Glasröhren) versehenen Kolben eine Atmosphäre aus Methan und Sauerstoff hergestellt. Das Methan kann aus Natrium-Acetat entwickelt werden; es ist vor dem Einleiten mittels Bromwasser und Natronlauge zu waschen. Nach 2—4 Tagen bei 30—37° C entwickelt sich Bac. methanicus fast rein als rötliche Haut auf der Flüssigkeit; er kann auf Fleischgelatine isoliert werden.

Literatur: Söhngen, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **15**, S. 514 (hier auch Abbildung eines besonders für diesen Zweck konstruierten Apparats); Kaserer, Zeitschr. f. d. landw. Versuchs-Wesen in Österreich, 8, 1905, S. 790, 793, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **15**, S. 574 f.

114. Verarbeitung von Wasserstoff. Zur Anhäufung kann nachstehende Lösung benutzt werden: 100 destill. Wasser, 0,2 KNO_3, 0,1 $NaHCO_3$, 0,05 K_2HPO_4, 0,02 $MgSO_4$, Spur Fe_2Cl_6, in flacher Schicht im Erlenmeyer-Kolben (oder besser in dem auf S. 51 erwähnten, gasdichten Gärapparat nach Hofstaedter, dessen langer Schenkel mit Knallgas gefüllt wird). Nach erfolgter Impfung mit Erde wird eine etwas CO_2 enthaltende Knallgas-Atmosphäre her-

[1]) Eventuell können die Versuche über die Verarbeitung von Methan und Wasserstoff mit Experimenten über die Bildung dieser Gase kombiniert werden; vergl. Kap. XXVI und XXVII.

Digitized by Google

gestellt; der Wasserstoff ist durch $CuSO_4$, saure und alkalische $K_2Mn_2O_8$-Lösung und konz. H_2SO_4 zu reinigen. Kultiviert wird bei 27—33° C, isoliert auf Fleischgelatine oder auf dem in § 115 angegebenen Agar. Im ersteren Falle werden am häufigsten gelbe Kurzstäbchen (aus der Verwandtschaft des Bact. turcosum) erhalten, im letzteren Bac. oligocarbophilus.

Literatur: Kaserer a. a. O. (s. § 113) und Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **16**, S. 685 f. (der von ihm Bac. pantotrophus genannte Organismus ist mit Bact. turcosum identisch), Nabokich und Lebedeff, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **17**, S. 350, Niklewski, Jahrb. f. wissenschaftl. Botanik, **48**, 1910, S. 113—142.

115. Verarbeitung von Kohlenoxyd. Auf der für den Nitrifikationsversuch (§ 100) angegebenen Ammonsulfat-Lösung kommt bei Aufbewahrung der mit Erde geimpften Kolben in der Leuchtgas-haltigen Laboratoriumsluft nicht selten nach 2 - 3 Wochen eine trockene, weiße Kahmhaut zur Entstehung, die vornehmlich von dem Kohlenoxyd-assimilierenden Bac. oligocarbophilus gebildet wird. Zur speziellen Anhäufung dieser Art ist jene Lösung (ohne Kreidezusatz) zu benutzen; nach Impfung mit Erde wird bei 20—25° C kultiviert und von Zeit zu Zeit etwas Leuchtgas in den Aufbewahrungsraum eingeleitet. Die Isolierung erfolgt entweder auf Gipsplatten (s. § 121) oder auf besonders präparierten Agarplatten: Das Agar ist zunächst durch Auslaugen mit destilliertem Wasser von allen löslichen Bestandteilen sorgfältig zu befreien, danach wird es in Mengen von 1 ½ % einer geeigneten Lösung (100 Wasser, 0,01 KNO_3, 0,01 K_2HPO_4) hinzugefügt.

Literatur: Beijerinck und van Delden, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **10**, S. 34 ff.

XXXV. Ammoniakbildung aus organischen Stickstoff-Düngern

116. Nährböden. Je nach ihrem Stickstoffgehalt sind die verschiedenen organischen Düngemittel in passenden Mengen (von Fleischmehl, Hornmehl, Blutmehl 1%, von

Digitized by Google

Knochenmehl, getrocknetem Gründünger usw. 3%) in kleine Erlenmeyer-Kolben oder in Reagenzgläser (für je zwei Versuche, vergl. §§ 117 bezw. 118) abzuwiegen und jedesmal mit ca. 10 ccm Leitungswasser aufzuschwemmen. Dem Wasser sind, sofern es sich nicht, wie beim Knochenmehl, um phosphorsäurereiche Materialien handelt, 0,05% K_2HPO_4 hinzuzufügen. Vergleichshalber können 1-proz. Pepton- bezw. Gelatine-Lösungen nebenbei Verwendung finden. Zur Isolierung der aëroben Ammoniakbildner ist Fleischgelatine, für die Anaëroben Fleischagar zurechtzustellen[1]).

117. Aërobe Ammoniakbildung. Je zwei Erlenmeyer-Kolben der verschiedenen Aufschwemmungen werden mit ca. 10% Erde geimpft und, nachdem jedesmal ein Kolben fünf Minuten im strömenden Dampf pasteurisiert worden ist, bei 20° C aufbewahrt. Nach fünf bis zehn Tagen ist starke Trübung, Deckenbildung und mehr oder minder deutlicher Fäulnisgeruch wahrnehmbar. Die vorhandenen Formen sind mikroskopisch festzustellen. Weiterhin anzufertigende Gelatineplatten pflegen von den nicht pasteurisierten Kolben vorwiegend Kurzstäbchen (Fluoreszenten, Bact. punctatum, vulgare, prodigiosum, coli, radiobacter u. a.), zuweilen auch Kokken zu liefern, während aus den pasteurisierten Lösungen in der Regel B. mycoides, subtilis, mesentericus und andere, meist besonders kräftige Ammoniakbildner erhalten werden.

Die Wirksamkeit der Reinkulturen kann in den zugehörigen Lösungen geprüft werden, denen vor dem Sterilisieren zweckmäßig etwas (im Trockenschrank in dünner Schicht auf 200° C erhitzte) Erde beizugeben ist. Das Ammoniak wird nach Zugabe von MgO

[1]) Zur Ergänzung des Bestandes an Fleischgelatine und Fleischagar sind 1000 ccm Bouillon und hieraus ca. 580 ccm Gelatine (für 70 Gläschen) und 320 ccm Agar (für 40 Gläschen) zu bereiten. Der verbleibende Bouillonrest wird mit dem bereits vorhandenen (vergl. § 106) vereint, sterilisiert und für etwaigen späteren Bedarf aufbewahrt.

Digitized by Google

abdestilliert, und durch Vergleich mit der aus den sterilen Kontrollkolben erhaltenen Menge das durch die Bakterien abgespaltene Quantum berechnet.

118. Anaërobe Ammoniakbildung. Von je zwei mit den betreffenden Aufschwemmungen beschickten Reagenzgläsern ist nach erfolgter Impfung eins in der soeben angegebenen Weise zu pasteurisieren. Nach Anbringung des Pyrogallol-Verschlusses wird bei 38° C kultiviert. Sobald (nach etwa fünf Tagen) eine kräftige Zersetzung eingetreten ist, wird mikroskopiert und die beteiligten Anaëroben in bekannter Weise (§ 41ff.) isoliert. Aus den nicht pasteurisierten Gläsern können besonders verschiedene Streptokokken-Varietäten erhalten werden, aus den pasteurisierten allerhand Formen aus der Gruppe des Bac. putrificus, die meist durch Bildung widerlich riechender Substanzen ausgezeichnet sind.

XXXVI. Ammoniakbildung aus Harnstoff und aus Cyanamid

119. Harnstoff-Zersetzung. Neben den in § 97 angegebenen Substraten kommen für die Anhäufung der Harnstoffbakterien des Bodens namentlich eiweißfreie Harnstofflösungen in Betracht, und zwar:

1. Bodenextrakt + 0,05 % K_2HPO_4 + 5 % Harnstoff,

2. Lösung nach Söhngen: 100 Leitungswasser, 5 Harnstoff, 0,05 K_2HPO_4, 0,5—1 Ammon- oder Calcium-Malat, Calcium-Citrat oder -Tartrat.

Mit den beiden Lösungen sind einige Reagenzgläser zu füllen und nach Impfung mit Erde bei 20—30° C zu kultivieren. Eventuell können durch Pasteurisieren der geimpften Gläser die Sporenbildner ausgelesen werden (vergl. § 117). Zur Isolierung dient entweder Harnstoff-Fleisch-

Digitized by Google

Gelatine bezw. Harnstoff-Fleisch-Agar (nach § 97), oder es wird aus den angegebenen Lösungen, denen man für diesen Fall aber nur $1^1/_2$% Harnstoff zusetzt, das entsprechende Agar bereitet. Neben Bact. erythrogenes und anderen gelbwachsenden Kurzstäbchen kommen meist Varietäten von Bact. vulgare zur Entwicklung, in den pasteurisierten Lösungen besonders Bac. pumilus und andere Sporenbildner. Bac. Pasteurii fehlt, da er nur in eiweißhaltigen Harnstofflösungen zu wachsen imstande ist.

Literatur: Löhnis, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **14**, S. 714; Söhngen, ebenda, **23**, S. 94 ff.

120. Cyanamid-Zersetzung. 150 ccm des (nach § 106 bereiteten) Bodenextrakts + 0,05% K_2HPO_4 werden mit 0,2% Kalkstickstoff, 0,01% Asparagin und 0,01% Traubenzucker versetzt. 50 ccm dieser Aufschwemmung werden auf einige Reagenzgläser verteilt, von denen man ein oder zwei sogleich mit Erde impft, während die übrigen durch dreimaliges Erhitzen im strömenden Dampf sterilisiert werden. Die restierenden 100 ccm versetzt man mit 10% Gelatine und verarbeitet sie in bekannter Weise; die Reaktion muß in diesem Falle deutlich alkalisch sein. Nach ein bis zwei Wochen ist aus den Anhäufungskulturen zunächst in die Lösung abzuimpfen, und weiterhin sind von hier aus Kalkstickstoffgelatine-Gußkulturen anzufertigen. Die zur Entwicklung kommenden Organismen sind Harnstoffbakterien (meist gelbwachsende Kurzstäbchen), die den aus dem Cyanamid unter der Einwirkung von Bodenkolloiden (Humus, Zeolithen usw.) zunächst entstehenden Harnstoff in Ammoniak überführen. Sie können auf den Standard-Nährböden fortgezüchtet werden.

Ob direkt Cyanamid-zersetzende Organismen im Boden tätig sind, ist noch nicht sichergestellt. Durch Porzellanfiltration (vergl. § 1, S. 9) keimfrei gemachte Cyanamidlösungen bleiben auch nach

Digitized by Google

Impfung mit keimreichen Erdauszügen meist unverändert, nur bei Gegenwart der kolloiden Erdbestandteile tritt eine lebhafte Harnstoffbildung ein, der dann die durch Bakterien bewirkte Ammoniakbildung folgt. Das Erhitzen der Kalkstickstofflösung im Dampf macht ebenso wie der Erdzusatz die Bakterien-Entwicklung möglich.

Über die Intensität, mit der die Cyanamid-Zersetzung in verschiedenen Erden verläuft, kann man sich in der Weise orientieren, daß man die betreffenden Erden mit der entsprechenden Menge Kalkstickstoff vermischt und dann nach kürzerer oder längerer Zeit Keimungsversuche darin ausführt. Störungen in der Keimung erweisen die ungenügende Zersetzung.

Literatur: Löhnis, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **14**, S. 87, 389; Ulpiani, Gazetta chimica ital., **40**, 1910, I, S. 613 (ref. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **29**, S. 235); Reis, Biochem. Zeitschrift, **25**, S. 460, 477; Kappen, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **26**, S. 633. Betr. Cyanamid-Darstellung sowie Cyanamid- und Harnstoff-Bestimmung vergl. Caro, Zeitschr. f. angewandte Chemie, **23**, 1910, S. 2405 ff.

XXXVII. Nitrifikation. Denitrifikation Nitratreduktion

121. Nitrifikation. Die Salpeterbakterien sind auf den gewöhnlich benutzten festen Nährböden nicht zur Entwicklung zu bringen. Die Gewinnung von Reinkulturen muß demgemäß aus den nach § 100 vorbereiteten Anhäufungskulturen[1]) entweder mit Hilfe des Tuschepunkt-Verfahrens (§ 48) oder (bei 25—30° C) unter Verwendung spezifischer Substrate erfolgen. Solche sind bereits in größerer Zahl angegeben worden; trotzdem ist die Rein- und Fortzüchtung der nitrifizierenden Organismen auch gegenwärtig noch eine der schwierigsten, bakteriologischen Aufgaben. Relativ am

[1]) Recht lebhafte Nitrifikation pflegt man auch in Bodenextrakt + 1 ‰ $(NH_4)_2SO_4$ + 0,5 ‰ K_2HPO_4 + Kreide nach Impfen mit Erde zu erhalten.

Digitized by Google

empfehlenswertesten erscheinen zur Züchtung der Nitritbakterien die Gips-Magnesia-Platten nach Omelianski und Makrinoff:

300 g Gips, 3 g $MgCO_3$ und 3 g $MgNH_4PO_4$ werden sorgfältig gemischt und mit einer unter Verwendung von humusreicher Erde (ca. 250 g pro Liter) bereiteten wässerigen Aufschwemmung zu einer homogenen, teigartigen Masse angerührt. Diese bringt man auf eine Spiegelglasplatte, streicht sie mit einem Messer zu einer $^1/_2$—$^3/_4$ cm hohen Platte aus und fertigt daraus (durch Ausstechen mittels einer ca. 8 cm im Durchmesser haltenden Glasschale) in die Petrischalen passende Scheiben sowie (durch Zurechtschneiden mit dem Messer) in die Reagenzgläser einzulegende Streifen. Nach dem vollständigen Erhärten werden sie mit den Glasgefäßen trocken sterilisiert, von unten her mit der Nährlösung, aus der man in diesem Falle das Ammonsulfat und das basische Magnesiumkarbonat fortläßt, befeuchtet und an der Oberfläche aus den Anhäufungskulturen geimpft. Neben den gelbbraunen Nitritbakterien-Kolonien kommen oft Ansammlungen des Bac. oligocarbophilus mit zur Entwicklung (vergl. § 115).

Für die Nitratbildner brachte Winogradsky folgendes Nitritagar in Vorschlag:

1000 Wasser, 15 Agar, 2 $NaNO_2$, 1 Na_2CO_3, 0,5 K_2HPO_4.

Während die Nitritbakterien in der gewöhnlichen Weise gefärbt werden können, ist bei den Nitratbakterien nach der Sporen-Färbungsmethode (§ 36) zu verfahren.

Literatur: Winogradsky, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **2**, S. 425; Omeliansky, ebenda, **5**, S. 652; Makrinoff, ebenda, **24**, S. 419.

122. Denitrifikation. Neben den in § 101 angegebenen Lösungen (Salpeterbouillon und Giltay-Lösung) können speziell für denitrifizierende Bodenorganismen noch folgende Anhäufungs-Flüssigkeiten Verwendung finden:

a) 100 Leitungswasser, 2 Calcium-Tartrat, -Citrat oder -Malat, 0,1—2 KNO_3, 0,05 K_2HPO_4;

Digitized by Google

b) 100 Leitungswasser, 2 Filtrierpapier oder Watte (Zellulose), 0,25 KNO_3, 0,05 K_2HPO_4.

Nach Impfung mit Erde wird bei 38° C kultiviert und aus den in kräftiger Gärung befindlichen Gläsern mehrmals in die gleiche Lösung übergeimpft. Die beteiligten Bakterien (Bact. Stutzeri, Fluoreszenten u. a.) werden auf Salpeteragar (s. § 101) isoliert und auf den Standard-Nährböden fortgezüchtet.

Literatur: Van Iterson, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **11**, S. 690 ff., **12**, S. 108 ff.

123. Nitratreduktion. Wie aus dem Dünger (§ 102) können auch aus dem Boden leicht zahlreiche Arten nitratreduzierender Keime gewonnen werden. Eventuell sind die vorhandenen Kulturen von Erdorganismen direkt nach den in § 102 angegebenen Methoden auf etwaige Befähigung zur Nitritbildung zu prüfen.

XXXVIII. Knöllchenbakterien

124. Mikroskopische Prüfung der Knöllchen. Aus den sauber abgespülten, aseptisch aufgeschnittenen Knöllchen verschiedener Leguminosenarten und ungleichen Alters sind gefärbte Ausstrichpräparate anzufertigen. Die Verschiedenheiten der Bakterienformen sowie das differierende Verhalten der Organismen bei der Färbung nach Gram (§ 35) sind eingehend zu studieren. Desgleichen sind von Knöllchen verschiedener Altersstadien Schnittpräparate nach den Regeln der botanischen Mikrotechnik herzustellen und zu untersuchen.

Nach Hiltner (Lafars Handbuch d. techn. Mykologie, Bd. **3**, S. 40) kann man die eindringenden bakterienhaltigen Schleimmassen in jungen Knöllchen besonders gut dadurch sichtbar machen, daß man die Schnitte in ein Färbebad bringt, das durch Auflösen gleicher Teile Fuchsin und Methylenblau in 1-proz. Essigsäure hergestellt wurde. Die Knöllchenzellen werden blau, die Bakterien rot, die Schleimfäden gar nicht gefärbt.

Digitized by Google

125. Isolierung der Knöllchenbakterien. 250 ccm des (nach § 106 hergestellten) Bodenextrakts + 0,05% K_2HPO_4 werden mit 1% Mannit versetzt und zu 125 ccm dieser Lösung 1½% Agar hinzugefügt. Nach erfolgter Filtration wird das Agar in Reagenzgläser, das Mannit-Bodenextrakt teils in kleine Erlenmeyer-Kolben, teils in Reagenzgläser portioniert und sterilisiert[1]).

Einige reingewaschene Knöllchen werden etwa fünf Minuten in 1‰ Sublimatlösung, danach in Alkohol gelegt und (beim Durchziehen durch die Flamme) der anhaftende Alkohol-Rest abgebrannt. Dann wird das auf sterilisierter Unterlage (abgeflammtem Objektträger oder dergl.) befindliche Knöllchen mit einem (in der Flamme) sterilisierten Messer geöffnet und mit der Platinnadel aus dem mit Bakterien erfüllten Teil eine Abimpfung in ein zuvor geschmolzenes, auf 45° C abgekühltes Mannit-Agar-Röhrchen angelegt. Von hier aus sind die erforderlichen Verdünnungen (im gleichen Substrat) anzufertigen und zu Gußkulturen zu verarbeiten. Gleichzeitig können auch aus den Knöllchenbakterien-Handelskulturen (Azotogen, Nitragin usw.) Gußkulturen hergestellt werden. Nach einigen Tagen erscheinen meist in überwiegender Anzahl die kreisrunden, weißlich-durchscheinenden, oft mit kompakterem weißlichen Zentrum versehenen, Schleimtropfen ähnlichen, fein granulierten Kolonien der Knöllchenbakterien. Diese selbst besitzen noch sämtlich die normale (nicht verzweigte) Kurzstäbchen-Form und sind größtenteils lebhaft beweglich. Zur Fortzüchtung dienen am besten Mannit-Agar-Strichkulturen. Auf den Standard-Nährböden wachsen die Knöllchenbakterien nur sehr kümmerlich.

[1]) Gleichzeitig ist, falls erforderlich, die noch vorhandene Bouillon (S. 125, Anm. 1) auf Gelatine, Agar und Traubenzucker-Agar zu verarbeiten.

Digitized by Google

126. Stickstoffbindung und Infektions-Versuche. Impft man die Reinkulturen in Mannit-Bodenextrakt, so entwickeln sich in 8—14 Tagen reichliche, weiße Schleimmassen, in denen bei hinreichend langer Versuchszeit auch die typischen Hypertrophien (wie in den Knöllchen) entstehen. Kommen größere Mengen Versuchsflüssigkeit (100 ccm in 300-cm-Erlenmeyer-Kolben) zur Verwendung, so kann nach drei Wochen eine deutliche Stickstoff-Zunahme (nach Kjeldahl) nachgewiesen werden. Ist an älteren Kulturen das Stickstoff-Bindungsvermögen verloren gegangen, so kann es dadurch regeneriert werden, daß man die betreffenden Bakterien in (im Reagenzglas) sterilisierte Erde impft.

Die Prüfung der Infektionskraft einer Kultur kann man (nach Harrison und Barlow) in der Weise vornehmen, daß man aseptisch herangezogene Keimlinge[1]) der Versuchspflanzen in 2-Liter-Kolben bringt, die je 300 ccm Asche-Maltose-Agar enthalten (4 g Holzasche werden mit 1000 ccm Leitungswasser ausgelaugt und dem Extrakt 4‰ Maltose und 2‰ K_2HPO_4 hinzugefügt). Die Pflanzen können in den mit Watte verschlossenen Gefäßen leicht steril erhalten werden, ebenso ist der Erfolg einer Impfung in dem durchscheinenden Substrat gut zu kontrollieren.

Literatur: Harrison and Barlow, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **19**, S. 268 (mit Photogrammen).

XXXIX. Freilebende Stickstoff-Assimilanten

127. Aërob stickstoffixierende Bakterien. In kleinen Erlenmeyer-Kolben befindliches Mannit-Bodenextrakt (vergl.

[1]) Die zunächst gründlich mit Wasser gereinigten Samen werden 30 Minuten in 2‰ Sublimatlösung gelegt und danach in sterilisiertem Wasser sorgfältig gewaschen. Durch Auflegen auf sterile Gelatine-Platten können sie auf ihre Keimfreiheit geprüft werden. Danach sind sie in das sterilisierte Keimbett zu übertragen.

Digitized by Google

§ 125) wird mit Erde geimpft uud 5—10 Tage bei 20—30° C gehalten. Es bildet sich eine runzelige, erst weißliche später braune Haut (sicherer im Winter als im Sommer, und regelmäßiger bei Verwendung fruchtbarer Erde als bei armem oder saurem Boden). Das gefärbte Ausstrichpräparat pflegt das in Abb. 39 wiedergegebene Bild zu liefern. Zwischen den großen Azotobacter-Zellen sind vereinzelt kleine, schlanke Stäbchen wahrnehmbar. Fast stets handelt es sich hierbei um eine den Knöllchenbakterien nahestehende, ebenfalls schwach stickstoffbindende Form, das Bact. radiobacter. Außer den genannten Arten kommen aber auch noch, und besonders wenn Azotobacter, der kräftigste der bisher bekannten Stickstoff-Assimilanten, zurücktritt, zahlreiche andere sporenfreie und sporenbildende Bakterien zur Entwicklung, die meist ebenfalls schwach Stickstoff fixieren.

Abb. 39.
Azotobacter-Rohkultur.
Vergr. 700-fach.

Die Trennung von Azotobacter und Radiobacter ist (wegen der schleimigen Beschaffenheit der Zellhäute) oft recht schwierig. Am ehesten kommt man zum Ziele, wenn man als Ausgangsmaterial zur Mannit-Agar-Gußkultur eine Abimpfung in Mannit-Bodenextrakt verwendet, die aber noch keine Hautbildung, sondern nur erst schwache Trübung zeigt.

Auf den Standard-Nährböden wächst Azotobacter nur mäßig, dagegen sehr gut auf Gipsplatten, die mit Mannitlösung getränkt sind. Besonders die braun bis schwarz werdenden Formen liefern sehr charakteristische Bilder. Die durch Einimpfen der Reinkulturen in Mannit-Lösung erzielbaren Stickstoffernten werden durch Zugabe von Humus oder humusreicher Erde meist beträchtlich erhöht.

Digitized by Google

Literatur: Beijerinck, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **7**, S. 574 (Azotobacter-Photogramme); Löhnis, ebenda, **14**, S. 582 ff. (Bact. radiobacter und andere Stickstoff-Assimilanten); Löhnis und Westermann, ebenda, **22**, S. 234 ff. (vergleichende Untersuchungen der verschiedenen Azotobacter-Formen); Krzemieniewski, Anzeiger d. Akad. Krakau, mathem.-naturw. Klasse, 1908, S. 993 ff. (Nachweis der Humuswirkung).

128. Anaërob stickstoffixierende Bakterien. Nicht selten, besonders bei schwacher Entwicklung des Azotobacter geht die zu dessen Anhäufung bestimmte Mannitlösung in Buttersäure-Gärung über. Die in diesem Falle tätigen Formen aus der Gruppe der Bac. amylobacter erhält man sicher, wenn man eine wässerige Dextrose-Lösung (2 g Traubenzucker in 100 ccm Leitungswasser zu je 10 ccm) in Reagenzgläser verteilt, reichlich mit Erde impft, 15 Minuten bei 80° C pasteurisiert und dann bei 30—38° C der Gärung überläßt. Zur Isolierung dient Traubenzucker-Fleischagar in Burri-Röhren (§ 41). Die Fortzüchtung hat anaërob auf zuckerhaltigen Substraten zu erfolgen. Von Zeit zu Zeit ist das Pasteurisieren zu wiederholen. Allen Amylobacter-Formen, die z. B. aus Milch, Flachs oder aus irgend einem andern Medium gezüchtet wurden, kann die Befähigung zur Stickstoffbindung durch Kultur in sterilisierter Erde verliehen werden.

129. Stickstoffixierende Algen. Leitungswasser + 0,02 % K_2HPO_4, geimpft mit 1—2 % Erde, gibt bei reichlicher Lüftung im Licht nach 4—8 Wochen eine mehr oder minder kräftige Vegetation hauptsächlich von blaugrünen Algen. Unter diesen befinden sich (schwierig, auf sorgfältig ausgewaschenem, mit wässeriger Kaliphosphat-Lösung getränktem Agar zu isolierende) stickstoffbindende Arten. Nebenbei sind aber auch stickstoffixierende Bakterien zugegen, die von den nicht selbst stickstoffbindenden Algen die nötigen Kohlenstoff-Verbindungen beziehen und ihnen im Austausch stickstoffhaltige Nahrung liefern. Werden die Versuche durch

Digitized by Google

Monate und Jahre fortgeführt, so entsteht allmählich ähnlich wie in der Natur auf feuchten, stickstoffarmen Sandstellen eine dicke, grüne Algendecke, deren ansehnlicher Stickstoffgehalt fast ausschließlich der Luft entstammt.

XL. Umsetzung mineralischer Substanzen

130. Phosphat-Lösung. Leitungswasser + 2% Traubenzucker füllt man in kleine Erlenmeyer-Kolben, in die vorher etwas Erde und eine kleine Messerspitze voll Di- oder Tri-Calcium-Phosphat gebracht wurde. Es wird bei 38° C kultiviert. Nachdem die bald eintretende Gärung einige Tage gedauert hat, werden Gußkulturen angelegt unter Verwendung von Bodenextrakt-Agar + 2% Traubenzucker. Bevor man das geimpfte Agar in die Schalen eingießt, bringt man in jede eine geringe Menge zuvor im Trockenschrank (im Reagenzglas) sterilisiertes Di- oder Tri-Calcium-Phosphat. Durch Hin- und Her-Neigen wird die gleichmäßig schwach getrübte Phosphat-Platte hergestellt. Die bei 38° C zur Entwicklung kommenden säurebildenden Kolonien lösen das Phosphat und umgeben sich mit einem durchscheinenden Hof (ähnlich wie die Milchsäurebakterien auf dem Kreideagar, Tafel III, Abb. 1, S. 82).

131. Eisenbakterien. Das Vorhandensein von Eisenbakterien in Wässern kann dadurch nachgewiesen werden, daß die betreffenden Wasserproben mit 0,05% Eisen-Ammon-Citrat versetzt und in hoher Schicht in Reagenzgläsern aufbewahrt werden. Gegebenen Falles entstehen nach einiger Zeit gelbliche Häute, Flocken und Absätze von Eisenbakterien. Diese sind mikroskopisch zu prüfen. Als Nährsubstrat empfahl H. Molisch eine Gelatine, bereitet aus Torfextrakt (gewonnen durch Auskochen eines Torfziegels) + 25% Mangan-Pepton.

Literatur: Molisch, Die Eisenbakterien. Jena 1910.

Digitized by Google

182. Schwefelwasserstoff-Bildung. Zahlreiche Bakterien-Arten bilden in Fleischbouillon Schwefelwasserstoff, wie an einem eingehängten Bleiazetat-Papierstreifen erkannt werden kann (vergl. § 31). Kräftige Entwicklung erhält man, wenn man Bouillon mit etwas Schwefelblume versetzt und mit Erde, Dünger und dergl. impft. Zur raschen Erkennung der beteiligten Bakterien dient die (von Beijerinck angegebene) Bleiweißprobe. Das geimpfte Fleischagar (oder Fleischgelatine) wird in der Petrischale mit Bleikarbonat vermischt; die H_2S-bildenden Kolonien umgeben sich mit einem braunen Hof. Man kann auch (nach Fromme) Fleischgelatine mit 3% Eisentartrat versetzen, die durch H_2S schwarz gefärbt wird.

Literatur: Beijerinck, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **6**, S. 196; Fromme, Über die Beziehungen des metallischen Eisens usw., Diss. med. Marburg 1891.

Digitized by Google

Anhang

I. Schlüssel zur Bakterien-Bestimmung

Micrococcus Cohn

Meist kreisrunde, zu zweien oder in Haufen, nie in Ketten oder in Paketen gelagerte Zellen.

A. Auf Gelatine und Agar weiß, grau, gelb oder orange

I. Gelatine verflüssigt, Milch koaguliert

a) Weiß — α) häufig pathogene Form
M. pyogenes γ *albus* (Rosenb.) Lehm. et Neum.
β) nicht pathogene Form
M. acidi lactis R. Krüger

b) Gelb — α) häufig pathogene Form
M. pyogenes β *citreus* (Passet) Lehm. et Neum.
β) nicht pathogene Form
M. luteus Cohn emend. Lehm. et. Neum.

c) Orange — α) häufig pathogene Form
M. pyogenes α *aureus* (Rosenb.) Lehm. et Neum.

II. Gelatine nicht verflüssigt, Milch koaguliert

a) Weiß . . . . . *M. lactis acidi* Leichm.
b) Gelb . . . . . *M. lactis acidi* Marpm.
c) Orange-rötlichbraun . . . . *M. umbilicatus* R. Weiß

III. Gelatine verflüssigt, Milch nicht koaguliert

a) Weiß . . . . . *M. butyri* Keith.
b) Gelb . . . . . *M. chromoflavus* Huß.
c) Grau-orange . . . . . *M. cremoides* Zimmerm.
d) Braungelb . . . . . *M. badius* Lehm. et Neum.

Digitized by Google

IV. Gelatine nicht verflüssigt, Milch nicht koaguliert
a) Weiß — α) unbeweglich . . . *M. candicans* Flügge.
β) beweglich . . *M. agilis albus* Catterina.
b) Gelb . . . . . *M. sulfureus* Zimmerm.
c) Orange . . . . . *M. aurantiacus* Cohn.
d) Braungelb . . . . *M. versicolor* (Guillebeau) Lhs.
e) Durchscheinende, irisierende Auflagen
M. concentricus Zimmerm.

V. Starke Schleimproduktion, besonders in Milch
a) Gelatine verflüssigt . . *M. Freudenreichii* Guillebeau
b) Gelatine nicht verflüssigt *M. pituitoparus* (Hohl) Lhs.

B. Auf Gelatine und Agar rosa — kirschrot
α) unbeweglich *M. roseus* (Bumm) Lehm. et Neum.
β) beweglich . . . . . *M. agilis* Ali-Cohen.

C. Auf Gelatine und Agar kobaltblau
M. cyaneus (Schröter) Cohn.

Sarcina Goodsir

Meist kreisrunde, bei Züchtung in flüssigen Substraten in Warenballen-ähnlichen Paketen gelagerte Zellen.

A. Auf Gelatine und Agar weiß, grau, gelb oder orange
a) Weiß — grau. — α) unbeweglich *S. alba* Zimmerm.
β) beweglich, sporenbildend
S. pulmonum Virchow.
b) Gelb. — α) unbeweglich
S. lutea Flügge, emend. Lehm. et Stubenr.
β) beweglich, sporenbildend
S. ureae (Beijerinck) Lhs.
c) Orange . . . . . *S. aurantiaca* Flügge.
d) Braungelb . . . . . *S. fulva* Stubenrath.

B. Auf Gelatine und Agar rosa — kirschrot
S. rosea Schröter emend. Zimmerm.

Streptococcus Billroth

Runde, lanzettliche bis deutlich kurzstäbchenförmige, bei Züchtung in flüssigen Substraten in Ketten angeordnete Zellen.

Digitized by Google

A. Gelatine nicht verflüssigt
I. Milch koaguliert
a) Gasbildung aus Traubenzucker *Str. mastitidis* Guillebeau.
b) Keine Gasbildung aus Traubenzucker
α) Zellen rund oder in Scheiben, nicht selten pathogen *Str. pyogenes* Rosenb.
β) Zellen rund, lanzettlich oder (besonders in Peptonbouillon) deutlich kurzstäbchenförmig *Str. lactis* (Lister) Lhs.
II. Milch nicht koaguliert
a) Gasbildung aus Traubenzucker . . *Str. Kefir* Migula.
b) Keine Gasbildung aus Traubenzucker *Str. lactis innocuus* Lhs.
III. Schleimbildung in Milch . . . *Str. hollandicus* Scholl.
B. Gelatine verflüssigt
a) weißwachsend *Str. gracilis* (Escherich) Lehm. et Neum.
b) gelb bis grüngelb gefärbt . *Str. coli brevis* Escherich.

Bacterium Cohn emend. Hueppe

Sporenfreie Stäbchen, meist relativ kurz, zuweilen in Fäden, gerade oder (selten) schwach gekrümmt.

A. Auf Fleisch-Nährböden nicht oder nur kümmerlich wachsend.
1. Lange, unbewegliche Stäbchen, oft deutlich anaërob *Bact. caucasicum* (v. Freudenr.) Lehm. et Neum.
2. Kurze, zum Teil bewegliche Stäbchen, deutlich aërob *Bact. radicicola* (Beijck.) Prazm.

B. Auf Fleisch-Nährböden gut wachsend.
I. Weiß bis grau, zuweilen schwach rötlich gefärbt. Meist keine Verfärbung des Substrats. Selten werden Agar oder Gelatine bräunlich.
1. Kolonien rund, gekerbt oder blattartig
a) Gelatine nicht verflüssigt
α) unbeweglich
1. Milch koaguliert, Gasbildung aus Milchzucker *Bact. acidi lactici* (Hueppe), *Bact. aërogenes* (Escherich) Lehm. et Neum.

Digitized by Google

2. Milch nicht koaguliert. Gasbildung aus Milchzucker . . . . *Bact. pneumoniae* Friedldr.
3. Milch koaguliert. Keine Gasbildung aus Milchzucker . . . . *Bact. limbatum* Marpmann.
4. Milch nicht koaguliert. Keine Gasbildung aus Milchzucker. *Bact. lactis innocuum* (Wilde) Lhs.
5. Kräftige Schleimbildung in Milch *Bact. lactis viscosum* (Adametz) Lehm. et Neum.

β) beweglich.

1. Milch koaguliert. Gasbildung aus Milchzucker. *Bact. coli* (Escherich) Lehm. et Neum.
2. Milch nicht oder langsam (labartig) koaguliert. Keine Gasbildung aus Milchzucker *Bact. radiobacter* (Beijck.) Lhs.
3. Milch nicht koaguliert. Keine Gasbildung aus Milchzucker. Zähhäutige, trockene, stark runzlige Kolonien, denitrifizierend *Bact. Stutzeri* Lehm. et Neum.
4. Milch nicht koaguliert. Keine Gasbildung aus Milchzucker. Eigenartig krümelige Kolonien mit bogenartigen Fortsätzen. Die Zellen zeigen deutliche Polfärbung; oft Involutions-Formen. Starke Schleimbildung in Salpeterlösung. *Bact. agreste* Lhs.

b) Gelatine verflüssigt

α) unbeweglich

Bact. disciformans (Zimmerm.) Lehm. et Neum.

β) beweglich

Bact. punctatum (Zimmerm.) Lehm. et Neum.

2. Kolonien mit wurstförmig gedrehten, band- oder strahlartigen, mitunter inselartigen Ausläufern *Bact. vulgare* (Hauser) Lehm. et Neum.

II. Weiß — grau; Substrat wird grün, blau oder tiefbraun verfärbt.

1. Gelatine verflüssigt, Substrat meist grün, selten braun *Bact. fluorescens* (Flügge) Lehm. et Neum.

Digitized by Google

2. Gelatine nicht verflüssigt
   a) Substrat meist grün, selten braun
      Bact. putidum (Flügge) Lehm. et Neum.
   b) Substrat blau bis schwarz
      Bact. syncyaneum (Ehrenbg.) Lehm. et Neum.

III. Gelb (zum Teil graugelb, grünlichgelb) bis orange gefärbt
1. Intensiv grüngelb; sehr kleine, lebhaft bewegliche Stäbchen, Gelatine langsam (kuglig) verflüssigt
   Bact. turcosum (Zimmerm.) Lehm. et Neum.
2. Kräftig zitronen- bis goldgelb
   a) nicht verflüssigend, nicht beweglich
      Bact. luteum (Flügge) Lehm. et Neum.
   b) verflüssigend, nicht beweglich
      Bact. helvolum (Zimmerm.) Lehm. et Neum.
   c) verflüssigend, beweglich
      Bact. herbicola Burri et Düggeli.
3. Zitronengelb mit roter Verfärbung des Substrats
   Bact. erythrogenes (Grotenf.) Lehm. et Neum.
4. Gelblichweiß bis dottergelb oder grauorange, selten bis bräunlichgelb wechselnd
   a) nicht verflüssigend, nicht beweglich
      Bact. cremoides Lehm. et Neum.
   b) verflüssigend, nicht beweglich
      Bact. nubilum Lehm. et Neum.
   c) verflüssigend, beweglich
      Bact. ochraceum (Zimmerm.) Lehm. et Neum.
5. Gelb, orange bis ziegelrot
   a) unbeweglich *Bact. fulvum* (Zimmerm.) Lehm. et Neum.
   b) beweglich . . . . . *Bact. chrysogloea* Zopf.

IV. Rosarot, karmin, rostrot bis braunrot gefärbt
   a) nicht verflüssigend, nicht beweglich
      Bact. latericium (Adametz) Lehm. et Neum.
   b) nicht verflüssigend, beweglich *Bact. Cowardi* (Huß) Lhs.
   c) verflüssigend, beweglich
      Bact. prodigiosum (Ehrenbg.) Lehm. et Neum.

Digitized by Google

V. Blau bis violett gefärbt
1. violett . *Bact. violaceum* (Schröter) Lehm. et Neum.
2. indigoblau *Bact. indigonaceum* (Claessen) Lehm. et Neum.
3. himmelblau bis blaugrün
Bact. caeruleum (Voges) Lehm. et Neum.

Bacillus Cohn emend. Hueppe.

Sporenbildende, gerade Stäbchen, oft von beträchtlicher Größe.

A. Auf Fleischnährböden nicht oder nur kümmerlich wachsend.
I. Aërob. Harnstoff zersetzend *B. Pasteurii* (Miquel) Migula.
II. Anaërob. Zellulose zersetzend
1. Wasserstoffbildend
B. fermentationis cellulosae Omelianski.
2. Methanbildend . . *B. methanigenes* Lehm. et Neum.

B. Auf Fleischnährböden aërob meist gut gedeihend.
I. Gelatinestich mit Ästchen besetzt
1. Zarte, wurzelartige Ausläufer; langsam beweglich
B. mycoides Flügge.
2. Haarartige, wolkenartig zusammenlaufende Ausläufer; lebhaft beweglich *B. sphaericus* A. Meyer et Neide.
3. Ästchen sehr kurz; unbeweglich *B. Ellenbachensis* Caron.
II. Gelatinestich ohne Ästchen
1. Kartoffelkultur dünn, durchscheinend *B. tumescens* Zopf.
2. Kartoffelkultur rein weiß, erhaben *B. oxalaticus* Zopf.
3. Kartoffelkultur weißgrau, flach, mehlig bestäubt
B. subtilis Cohn.
4. Kartoffelkultur cremefarbig bis rötlich, schleimig (ähnlich Bact. pneumoniae) *B. pumilus* A. M. et Gottheil.
5. Kartoffelkultur gelblich-bräunlich (ähnlich Bact. coli).
a) Langsam beweglich
α) auf Gelatine und Agar Subtilis-ähnlich
B. Megaterium De Bary.
β) gelbgefärbt, Agar wird braun, Gelatine kuglig verflüssigt . . *B. petasites* A. M. et Gottheil.

Digitized by Google

b) Lebhaft beweglich
α) auf Gelatine und Agar grau, durchscheinend; sehr große Sporen . *B. asterosporus* (A. M.) Migula.
β) gelb, kleine Stäbchen mit zylindrischen Sporen *B. parvus* A. M. et Neide.
γ) gelb bis dunkelrotbraun, Agar schwarzbraun verfärbt, Sporen elliptisch *B. silvaticus* A. M. et Neide.

6. Kartoffelkultur mit faltigen Erhebungen
a) weiß-grau . . . *B. mesentericus vulgatus* Flügge.
b) gelblich . . . . *B. mesentericus fuscus* Flügge.
c) rosa-rotbraun . . . *B. mesentericus ruber* Globig.
d) graublau-braunschwarz *B. mesentericus niger* Lunt.

C. Obligat anaërob. Auf Fleischnährböden gut wachsend.

1. Kräftig Eiweiß zersetzend; keine Buttersäure bildend. Stäbchen mit Sporen meist in Plektridien-Form *B. putrificus* Bienstock.

2. Eiweiß zersetzend und Buttersäure bildend. Stäbchen mit Sporen meist in Plektridien-Form *B. paraputrificus* Bienstock.

3. Buttersäure bildend, nicht Eiweiß zersetzend. Stäbchen mit Sporen meist in Clostridien-Form *B. amylobacter* van Tieghem emend. A. M. et Bredemann.
a) beweglich . . . . . *B. amylobacter var. mobilis.*
b) unbeweglich . . . *B. amylobacter var. immobilis.*

4. Lange, schlanke, borsten- bis stecknadelförmige Stäbchen; von den Abbauprodukten des B. putrificus lebend. *B. postumus* Heim.

II. Demonstrations-Experimente

Da die Form der Bakterien sowohl für die Erkennung der Art wie namentlich für die landwirtschaftlich allein bedeutungsvolle Leistung der Mikroorganismen von sehr untergeordneter Bedeutung ist, so erscheint speziell für Demonstrationszwecke ein Mikroskop als durchaus entbehrlich, ganz abgesehen von dem

Digitized by Google

Kostenpunkt und dem berechtigten Bedenken, ungeübten Beobachtern ein so wertvolles Instrument in die Hand zu geben. Einige gute Abbildungen genügen vollauf, wenn man sich nicht darauf beschränken will, die drei Grundformen an einer Billardkugel, einer Wurst (oder einem Lampenzylinder) und an einen Korkzieher zu demonstrieren.

Für die Versuche sind im allgemeinen etwas größere Gefäße, als sie sonst benutzt werden, empfehlenswert. An Stelle der gewöhnlichen Petrischalen (von 10 cm Durchmesser) verwendet man zweckmäßig ca. 12—15 cm im Durchmesser haltende Doppelschalen. Ebenso treten an Stelle der 50-ccm-Erlenmeyer-Kolben solche von 300—500 ccm Inhalt oder größere Rundkolben (von 1—2 Liter Inhalt). Auch für die Reagenzglas-Kulturen sind genügend große Gläser (ca. 25 × 220 mm) zu wählen, die am besten in Schaukästen unterzubringen sind (vergl. Anhang III).

Verbreitung, Entwicklung und Eigenschaften der Bakterien. Der Keimgehalt von Luft, Wasser, Milch, Butter, Käse, Stallmist und Boden kann nach §§ 16, 20, 50, 75, 80, 89 und 107 nachgewiesen werden.

Die entweder von solchen Gußkulturen (nach § 21) isolierten oder direkt von einem bakteriologischen Laboratorium bezogenen Reinkulturen der häufigsten Bakterien (weiße und gelbe Mikrokokken aus Luft oder Milch, Fluoreszenten, Heu-, Kartoffelbazillen usw.) sind auf die Standard-Nährböden zu übertragen (§§ 29—31). Gut entwickelte Kulturen können nach den im Anhange III folgenden Angaben konserviert werden.

Die Heubakterien eignen sich ausgezeichnet zur Demonstration der Kochfestigkeit der Bakterien-Sporen (vergl. § 33), die Buttersäurebakterien in der faulenden Kartoffel zum Nachweis des Vorhandenseins luftscheuer Mikroorganismen (§§ 40, 41).

Wegen des für agrikultur-bakteriologische Versuche in den verschiedensten Richtungen ungemein fruchtbaren Prinzips der Anhäufungsversuche s. § 46.

Milchbakteriologie. Die für die bakteriologische Milchprüfung in erster Linie in Betracht kommenden Methoden (Gußkulturen, Schleuderprobe, Reduktase- und Katalaseprobe, Koch- und

Digitized by Google

Alkoholprobe, Milch- und Labgärproben) wurden in §§ 50—56 besprochen. Besondere Berücksichtigung verdient das auf den Ausstellungen der „Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft" übliche Milchprüfungs-Verfahren (s. § 56, Lit.). Führt man die Katalaseprobe mit derselben Milch nach verschieden langer Aufbewahrungsdauer aus, so kann die in der Milch vor sich gehende Keimvermehrung deutlich sichtbar gemacht werden. (Daß fast alle lebenden Zellen Wasserstoff-Superoxyd zerlegen, läßt sich mit Hilfe des Perhydrol-Mundwassers sehr anschaulich demonstrieren).

Von hervorragender praktischer Bedeutung ist der Nachweis von Fremdinfektionen nach § 57.

Die Tätigkeit der säurebildenden und der käsestofflösenden Milchbakterien ist unter Benutzung der in §§ 60 und 63 angegebenen Methoden besonders schön zu erkennen. Schleimbildner können nach § 66 angehäuft werden. §§ 71—73 unterrichten über das abnorme Verhalten erhitzter Milch, sowie über die Unmöglichkeit, Milch sicher zu sterilisieren.

Dünger- und Boden-Bakteriologie. In Verbindung mit Gußkulturen (§§ 89 und 107) sind Versuche über CO_2-Entwicklung (Atmungsversuche) recht instruktiv (vergl. §§ 95 und 109). Die starke Gasentwicklung im lagernden Mist ist an dem in einer festverschlossenen Flasche befindlichen Material ohne weiteres zu erkennen. Wegen der verschiedenen Möglichkeiten der Pektin- und namentlich der Zellulose-Zersetzung vergl. §§ 91, 92, 111 und 112.

Von den Versuchen über Ammoniakbildung aus organischen Handelsdüngern, aus Harnstoff und aus Cyanamid (§§ 97, 117, 118, 120) geben besonders die beiden zuerst genannten sehr anschauliche Resultate. Die Nitrifikation (§ 100) ist dadurch interessant, daß trotz kaum sichtbarer Entwicklung doch eine recht lebhafte Umsetzung stattfindet. Die Denitrifikation (§ 101) wird zweckmäßig sowohl in hoher wie in flacher Schicht (Reagenzglas und Erlenmeyer-Kolben) angesetzt; man kann dann zeigen, daß sie nur bei weitgehendem Luftabschluß lebhaft wird, mithin im gut durchlüftetem Ackerboden keine erhebliche Rolle zu spielen vermag.

Die Knöllchenbakterien sind nach dem in § 125 angegebenen Verfahren relativ leicht rein zu erhalten. Zur Demonstra-

Digitized by Google

tion der Bakterien-Ansiedelungen in den Wurzelknöllchen eignen sich Lupinenwurzeln meist am besten. Wegen Infektionsversuchen vergl. § 126. Die Azotobakter-Anhäufung (§ 127) kann außer in mit Erde geimpfter Mannitlösung auch auf den mit dieser Lösung getränkten, oben mit ein klein wenig Erde bestreuten Gipsplatten vorgenommen werden. Die gleichzeitige Prüfung mehrerer Bodenproben (Lehm, Sand, Moor usw.) gibt oft auffallend verschiedene Bilder.

Zum Nachweis der Phosphatlösung sind Dicalciumphosphat-Platten (§ 130), zur Demonstration der Schwefelwasserstoff-Bildung durch Bakterien die Bleiweißprobe (§ 132) beconders geeignet.

Impft man die hauptsächlich in Betracht kommenden Lösungen, diese zum Teil in flacher und in hoher Schicht, gleichzeitig mit derselben Erde und hält man die einander entsprechenden Versuchsgefäße bei verschiedenen Temperaturen, so kann man in überzeugender Weise dartun, daß zahlreiche verschiedene, eventuell einander direkt entgegenarbeitende Gruppen von Mikroorganismen im Boden nebeneinander vorhanden sind, daß es aber vor allem von den physikalischen und chemischen Einflüssen (Bearbeitung, Düngung und Benutzung des Bodens) abhängt, ob und in welchem Umfange die Bakterien-Tätigkeit jeweils zur Entfaltung kommt.

III. Herstellung von Dauerpräparaten

Am schönsten präsentieren sich die Bakterienkulturen im allgemeinen im frischen Zustande. Doch fallen auch die Dauerpräparate oft recht befriedigend aus; für viele Fälle ist das Vorhandensein einer solchen bakteriologischen Sammlung kaum zu entbehren. Von Králs bakteriologischem Laboratorium (s. Anhang V) können Dauerpräparate käuflich erworben werden; sie sind allerdings nicht billig.

Bei der Herstellung halte man sich an folgende Regeln: Gußkulturen in Petrischalen konserviert man in der Weise, daß man nach Abheben der Deckelschale den das Substrat enthaltenden Unterteil mittels Plastilin luftdicht auf eine sterilisierte Glasplatte

Digitized by Google

aufkittet. Mehrere nebeneinander placierte Schalen überdeckt man mit einer zweiten Glasscheibe und gibt dem Ganzen durch Anbringen eines einfachen Holzrahmens Kastenform. Handelt es sich um Gelatineplatten, so ist ein vorheriges Abtöten der Kolonien meist nicht zu umgehen, besonders dann nicht, wenn verflüssigende Bakterien in Frage kommen. Zu diesem Zwecke legt man in den Deckel der (umgekehrten) Petrischale ein Stück Filtrierpapier, das man mit Formalin tränkt. Die entstehenden Formaldehyd-Dämpfe töten die Bakterien nicht nur, sondern bringen meist (doch nicht bei allen Arten) auch die verflüssigte Gelatine wieder zum Erstarren; diese behält jedoch ihr Ansehen (als ob sie noch flüssig wäre) unverändert bei. Leider verblassen aber die Farben gleichzeitig sehr und die Platte wird oft, besonders wenn man das Formalin zu lange einwirken läßt, auch durch zu weitgehendes Austrocknen unansehnlich. Soweit dies möglich ist (speziell bei Agar-Platten) vermeidet man deshalb lieber die Formalin-Behandlung und nimmt nur das Festkitten vor, am besten schon etwas bevor der Höhepunkt in der Entwicklung erreicht wurde.

Sehr schöne und gut haltbare Demonstrations-Objekte erzielt man, wenn man die (nach § 28) in Soyka-Fläschchen angelegten Riesenkolonien in der Weise konserviert, daß man den Wattestopfen abbrennt, ihn ein kleines Stück in den Hals hineinschiebt und diesen durch Aufgießen von Pech, das man in einer Porzellanschale zum Schmelzen brachte, luftdicht verschließt[1]). Mehrere solcher Fläschchen kann man dann in länglichen Holzklötzchen nebeneinander montieren, indem man die Hälse in entsprechende Ausbohrungen einsteckt, mit etwas Watte feststopft und an der einen Längsseite des Holzklötzchens die entsprechenden Etiketten anbringt (eventuell so, daß sie leicht ausgewechselt werden können).

Bei Reagenzglaskulturen verfährt man in entsprechender Weise. Nur bei in lebhafter Verflüssigung begriffenen Gelatinekulturen wird man Formalin, mit dem der Wattestopfen schwach zu befeuchten ist, nicht entbehren können. Im übrigen gibt auch

[1]) Etwa entstandene Pechflecken können mittels Xylol leicht entfernt werden.

Digitized by Google

hier rechtzeitiger, luftdichter Abschluß mittels Pech die günstigsten Resultate. Zur Demonstration sind (für je 6 Gläser berechnete) Schaukästen sehr geeignet, die oben und unten entsprechende Ausbohrungen (wie die Reagenzglasgestelle) besitzen, vorn und hinten durch Glasplatten und oben durch einen Schiebedeckel geschlossen sind. An der einen Seite sind Einstecköffnungen für Etiketten vorzusehen.

Gute Dauerpräparate liefern auch die Milch- und besonders die Labgärproben. Jene sind nach Aufgießen von ein wenig Formalin luftdicht zu verschließen. Die Käschen werden dagegen durch Einlegen in absoluten Alkohol (während einiger Wochen) gehärtet. Dann kann man daraus sehr schöne Schnittpräparate anfertigen, die in Alkohol oder Formalin-Wasser aufzubewahren sind.

IV. Laboratoriums-Einrichtung

Über Apparate und Instrumente wurde im Kapitel I das Wichtigste mitgeteilt. Dort wurde auch bereits betont, daß in vielen Fällen einfache, mit einigem Geschick zustande gebrachte Improvisationen vollauf genügen. Wegen der für Demonstrationsversuche benötigten größeren Flaschen, Gipsplatten usw. vergl. Anhang II. Gummischläuche, Thermometer, Thermoregulatoren, Porzellanschalen und sonstige Laboratoriums-Bedürfnisse müssen natürlich ebenfalls, je nach der Ausdehnung der geplanten Arbeiten, vorhanden sein. Als Wagen genügen für die meisten Fälle, speziell auch für das Abwiegen der zur Bereitung der Nährlösungen erforderlichen Substanzmengen, solche einfachster Konstruktion (z. B. die kleinen Krämer-Handwagen mit Hornschalen).

Die Fenster des Laboratoriums sollen, wenn irgend möglich, nach Norden gelegen sein. Das Vorhandensein eines Abzugs für den Dampftopf ist erwünscht. Desgleichen erweist sich ein Eisschrank speziell für die Sommermonate oft recht nützlich. Außer dem Mikroskopiertisch sollte ein besonderer Tisch (für Kochen usw.) und, wenn irgend möglich, auch ein Aufwaschtisch verfügbar sein.

Am Mikroskopiertisch ist der Sitzplatz (in etwa 1—1,20 m Länge) von allen Kästen usw. freizuhalten (vergl. Abb. 8 auf S. 11).

Digitized by Google

Die seitlich angeordneten Schubkästen (für das gesamte Arbeits-Material) und der Mikroskop-Schrank können zwecks Raumersparnis eventuell rechtwinklig zum Sitzplatz zu stehen kommen. Die Breite des Tisches ist zweckmäßig auf 60—70 cm zu bemessen; die Entfernung vom Fenster soll 1 m nicht überschreiten. Als Mikroskopierstuhl genügt ein einfacher dreibeiniger Schemel von angemessener Höhe vollkommen.

Ein Schrank dient zum staubfreien Aufbewahren der Glasgerätschaften usw. Außerdem sind einige Regale an passenden Stellen für Chemikalien, Töpfe, Reagenzglas-Gestelle usw. anzubringen (Tiefenmaße 20—30 cm, Abstände der Zwischenbretter, je nach der Verwendung, 20—32 cm).

Für Tische und Regale hat sich folgende (von Wortmann angegebene) Beize ausgezeichnet bewährt:

Lösung I	Lösung II
100 g Kupfersulfat	100 g salzsaures Anilin
50 g chlorsaures Kali	40 g Chlorammonium
615 ccm Wasser	615 ccm Wasser.

Beide Lösungen werden dreimal wechselsweise aufgetragen; zwischendurch muß das Holz jedesmal zunächst wieder trocken werden. Zuletzt nimmt man die grünliche, mißfarbige Schicht mit lauwarmem Wasser weg; nach erfolgtem Trocknen wird ein wenig gekochtes Leinöl mittels eines Läppchens eingerieben und der Tisch zuletzt mit Wasser und Seife abgewaschen. Das Holz nimmt bei dieser Behandlung eine gleichmäßig schwarze Farbe an und wird sehr widerstandsfähig gegen Säuren und Laugen.

Illustrierte Beschreibungen größerer bakteriologischer Laboratorien finden sich in folgenden Arbeiten:

Aderhold, Die Kaiserl. Biologische Anstalt für Land- und Forstwirtschaft in Dahlem, Dtsche. landw. Presse 1905, S. 673 und Mitt. a. d. Biolog. Reichsanstalt, Heft 1, 1906;

v. Freudenreich, Das bakteriologische Laboratorium der schweizerischen landw. Versuchsanstalten Liebefeld-Bern, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., 13, S. 631;

Knoll und Kornauth, Die K. K. landw.-bakteriologische

Digitized by Google

und Pflanzenschutz-Station in Wien, Zeitschr. f. d. landw. Vers.-Wesen in Österreich, 1902, S. 697;

L. Russell, Description of the laboratories in agricultural bacteriology, Ann. Rep. Wisconsin Agric. Exp. Station, 21, S. 368;

Wehmer, Das Laboratorium für technische Bakteriologie an der Techn. Hochschule Hannover, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., 26, S. 667.

V. Bezugsquellen

Neben den kleineren, den örtlichen Bedarf deckenden Glaswaren-, Drogenhandlungen usw., kommen hauptsächlich folgende größere Firmen in Betracht: Paul Altmann, Berlin NW, Luisenstr. 47 (Apparate und Gerätschaften); Dr. G. Grübler & Co., Leipzig, Liebigstr. 1b (Farben, Reagentien usw. für Mikroskopie); Fr. Hugershoff, Leipzig, Carolinenstr. 13 (Gerätschaften, speziell Zentrifugen und Schleudergläschen zur Milch-Leukozyten-Probe); Králs Bakteriologisches Laboratorium, Prag I, Kleiner Ring 11 (Reinkulturen, Dauerpräparate, Mikrophotogramme); F. und M. Lautenschläger, Berlin N 39, Chausseestr. 92 (Apparate, Geräte usw.); E. Leitz, Optische Werkstätte, Wetzlar (Mikroskope); E. Merck, Chem. Fabrik, Darmstadt (Chemikalien, speziell für vergleichende Untersuchungen in fast allen größeren Laboratorien der Welt benutzt); Dr. Rob. Muencke, Berlin NW 6, Luisenstr. 58 (Apparate, Geräte usw.); C. Reichert, Wien VIII, Bennogasse 24—26 (Mikroskope); Dr. Herm. Rohrbeck Nachf., Berlin NW, Karlstr. 20a (Apparate, Geräte usw.); F. Sartorius, Göttingen (Wagen, Brutschränke); W. und H. Seibert, Optisches Institut, Wetzlar (Mikroskope); Vereinigte Fabriken für Laboratoriumsbedarf, G. m. b. H., Berlin N 39, Scharnhorststr. 22 (Apparate, Geräte usw.); M. Wallach Nachf., Cassel (Apparate und Geräte); Carl Zeiß, Optische Werkstätte, Jena (Mikroskope).

Digitized by Google

Sachregister

Abstiften der Kolonien 27.
Abwägen, steriles 95.
Acetate, Methanbildung 109.
acidophile Bakterien 90.
Aërobacter 81.
Äskulin-Bouillon 71, 81.
Agar 15, 18—20, 22 f., 47, 53.
Algen, Kultur 134.
Alkohol-Nachweis 91.
— -Probe 77.
Amid-Assimilation 116.
Ammon-Assimilation 117.
Ammoniak-Bildung 124 ff.
— -Nachweis 114.
anaërobe Bakterien 63—67, 93, 100, 106, 126, 134.
Anhäufungsversuche 68.
Anilinfarben 36, 38, 46.
Anilin-Viktoriablau 54.
Antagonismus 67.
Apochromate 39.
Apparate 5—9.
Arbeitsregeln 13.
Aromabakterien 87.
Ausstrichpräparate 36—38, 41 f., 83.
Autoklav 6 f., 18 f.
Auxanographie 67.
Azotobacter 47, 133 f.
Bacillus amylobacter 62, 107, 134, 143.
— asterosporus 122, 143.
— casei 84.
— Ellenbachensis 142.
— fermentationis cellulosae 142.
— Megaterium 142.
— mesentericus fuscus 143.
— — niger 143.
— — ruber 143.
— — vulgatus 52, 62, 93, 122, 125, 143.
— methanicus 123.
— methanigenes 142.
— mycoides 125, 142.
— oligocarbophilus 124.
— oxalaticus 142.
— paraputrificus 143.
— parvus 143.
— Pasteurii 112, 127, 142.
— petasites 142.
— postumus 143.
— pumilus 116, 127, 142.
— putrificus 93, 126, 143.
— silvaticus 143.
— sphaericus 142.
— subtilis 52, 93, 122, 125, 142.

Digitized by Google

Bacillus tumescens 142.
Bacterium acidi lactici 84, 139.
— aërogenes 81, 84, 116, 139.
— agreste 140.
— caeruleum 142.
— casei 84.
— caucasicum 84, 139.
— chrysogloea 141.
— coli 81, 112, 116, 125, 140.
— Cowardi 141.
— cremoides 141.
— discoformans 140.
— erythrogenes 112, 116, 127, 141.
— fluorescens 96, 112, 116, 125, 130, 140.
— formicicum 110.
— fulvum 141.
— Güntheri 84.
— helvolum 141.
— herbicola 141.
— indigonaceum 142.
— lactis 84.
— — acidi 84.
— — innocuum 140.
— — viscosum 140.
— latericium 141.
— limbatum 140.
— luteum 141.
— nubilum 141.
— ochraceum 141.
— pneumoniae 140.
— prodigiosum 112, 141.
— punctatum 96, 125, 140.
— putidum 141.
— radicicola 133, 139.
— radiobacter 116, 125, 133, 140.
Bacterium Stutzeri 130, 140.
— syncyaneum 141.
— turcosum 124, 141.
— violaceum 142.
— vulgare 112, 125, 140.
Bechergläser 12.
Beleuchtungs-Apparat 39 f.
Bestimmung der Bakterien 57 bis 62, 83, 137—143.
Bezugsquellen 150.
Bierwürze 103, 108.
Bleiweißprobe 136.
Blende 40, 43.
Blutmehl-Zersetzung 124 f.
Boden, Keimgehalt 119.
Bodenextrakt-Nährböden 118.
Bodenproben, Entnahme 120.
Bouillon 16 f., 48 f.
— Entzuckerung 50.
Brotbrei 103.
Brutschränke 7.
Butter, Keimgehalt 94.
Buttersäure-Bakterien 62, 92 f.
Butyrin-Agar 96.
Calciumcyanamid 127.
Canada-Balsam 37.
Carbolfuchsin 46.
Caseïn-Lösung 85—87, 100 f.
Chloroform-Methylenblau 83.
Clostridien 63.
Colibakterien, Nachweis 81.
Cyanamid-Zersetzung 127.
Dampf-Sterilisation 5—7.
Darmbakterien, Zählung 105.
Darm-Milchsäurebakterien 83.
Dauerpräparate 146—148.

Digitized by Google

Deckgläser 12.
Demonstrations-Experimente 143 bis 145.
Denitrifikation 114, 129.
Dextrose-Agar 20, 48.
— -Lösung 134.
Diphenylamin-Reaktion 114.
Dünger, Keimgehalt 104—107.
Ein-Zell-Kultur 69.
Eisenbakterien 135.
Eisentartrat-Gelatine 136.
Eiweiß, Zersetzung 100, 109.
Entzuckerung der Bouillon 50.
Erdkulturen 132, 134.
Erdproben, Entnahme 120.
Erhitzung der Milch 92 f.
Erlenmeyer-Kolben 12.
Essigsäure-Bouillon 90.
Exkremente, Keimgehalt 104 bis 107.
Färben der Bakterien 36—38, 54, 83, 130.
Fäzes, Keimgehalt 104—107.
fermentierte Milch 89.
Fettsäuren, Entstehung 100.
— Zersetzung 101, 109.
Fett-Zersetzung 96.
Fibrin-Nachweis 75.
Filtrier-Apparate 8.
Fixieren 36, 60.
Fleischmehl-Zersetzung 124 f.
Fleisch-Nährböden 15—23.
Fleischpepton-Molkengelatine 72.
Formalin zur Konservierung 147.
Formiat-Vergärung 110.
Gärapparate 51.
Gärproben 78—80, 92.
Gärungsintensität der Erde 121.
Geißelpräparate 45 f.
Gelatine 15, 17 f., 47—49.
Giltay-Lösung 115.
Gipsplatten 129, 133.
Gläser, Vorbereitung 15, 21.
Glyzerin-Vergärung 101.
Gram-Färbung 54.
Gründünger, Zersetzung 125.
Guajakol 92.
Gußkulturen 25, 35, 46, 53.
Hängender Tropfen 42—44.
Harnsäure-Zersetzung 113.
Harnstoff-Zersetzung 111, 126.
Hefen-Extrakt 90.
— -Züchtung 91, 102.
Heißluft-Sterilisator 5.
Heißwasser-Trichter 8.
Heubakterien 52.
Heyden-Agar 72.
Hippursäure-Zersetzung 112.
Hornmehl-Zersetzung 124 f.
Immersion 39—41.
Indol 49.
Instrumente 10—12.
Isolierung der Bakterien 32—35, 68—70.
Jaourt 89.
Jauche 105.
Jod-Jodkalium-Lösung 54.
Jodoform-Reaktion 91.
Käse, Keimgehalt 97.
Kalkstickstoff 127.
Kanada-Balsam 37.
Kapsel-Färbung 88.

Digitized by Google

Karbol-Fuchsin 46.
Kartoffel-Bakterien 62.
— -Fäulnis 62.
— -Nährböden 23 f., 47.
Kaseïn-Lösung 85—87, 100 f.
Katalase-Probe 76, 92, 120.
Kefir 89.
Keimgehalt des Boden 119.
— der Butter 94.
— des Düngers 104.
— des Käses 97.
— der Luft 26, 80, 93.
— der Milch 72.
— des Wassers 31, 80, 81.
Kieselgur-Filter 9.
Klatsch-Präparate 97.
Knochenmehl-Zersetzung 125.
Knöllchen-Bakterien 130—132.
— -Bildung 130, 132.
Kochprobe der Milch 77.
Kohlenoxyd-Umsetzung 124.
Kohlensäure-Bildung 110, 121.
Kolonien 27—30, 35.
Konservieren der Kulturen 146 bis 148.
Kot, Keimgehalt 104—107.
Kreide-Agar 82.
Kumiß 89.
Labenzym 85—87.
Lab-Gärproben 79, 148.
Laboratoriums-Einrichtung 148 bis 150
— -Regeln 13 f.
Lackmus 50, 72.
Laktat-Vergärung 101, 109.
Laktobazillen 84, 90, 99.
Laktose-Agar 72.
— -Hefen 91.
Leguminosen, Knöllchenbildung 130, 132.
Leukozyten-Probe 73.
Literatur 2—4.
Luft, Keimgehalt 24—26, 80, 93.
Lugolsche Lösung 54.
Magnesia-Gips-Platten 129.
Mannit-Nährböden 131—133.
Mazun 89.
Messung der Bakterien 44 f.
Methan-Bildung 109.
— -Oxydation 123.
Methylenblau-Reduktion 75.
Micrococcus acidi lactis 84, 137.
— agilis 138.
— — albus 138.
— aurantiacus 138.
— badius 137.
— butyri 137.
— candicans 138.
— chromoflavus 137.
— concentricus 138.
— cremoides 137.
— cyaneus 138.
— Freudenreichii 138.
— lactis acidi 84, 137.
— luteus 137.
— pituitoparus 88, 138.
— pyogenes 137.
— roseus 138.
— sulfureus 138.
— umbilicatus 137.
— versicolor 138.
Mikrokokken 84, 100, 111 f.

Digitized by Google

Mikrometer 44 f.
Mikroskop 10, 14, 39—41.
Mikroskopier-Tisch 148 f.
Milch 23, 48, 71 ff.
— -Agar 86.
— Alkoholprobe 77.
— -Anaërobe 93.
— Aromabildung 87.
— -Erhitzung 92 f.
— -Fehler 80.
— fermentierte 89.
— -Gärproben 78—80, 92.
— -Gerinnung 78.
— -Hefen 91.
— -Kataläseprobe 76, 92.
— Keimgehalt 72.
— Kochprobe 77.
— mikroskopische Prüfung 74.
— peptonisierte 99.
— -Peroxydasen 92.
— -Reduktaseprobe 75.
— Schleimbildung 88.
— -Schleuderprobe 73.
Milchsäure-Bakterien 82—85, 99.
Milchzucker-Bouillon 71, 81.
Molekular-Bewegung 44.
Molken-Nährböden 71.
Nährböden 15—24, 71 f., 103, 118.
Nährlösung nach Cohn 51.
— nach Fränkel 52.
— nach Maaßen 51.
— nach Uschinsky 51.
Nitrat-Nachweis 114.
— -Reduktion 115, 130.
Nitrifikation 113, 128.
Nitrit-Agar 129.
Objektträger 12, 43.
Öl-Immersion 39, 41.
Paraphenylendiamin 92.
Pasteurisieren 52, 55, 92 f.
Pektin-Darstellung 108.
— -Zersetzung 107, 122.
peptonisierende Bakterien 93.
peptonisierte Milch 99.
Peptonwasser 51.
Peroxydasen 92.
Petrischalen 10, 35.
Pflaumendekokt-Gelatine 103.
Phosphat-Lösung 135.
Pinzetten 10.
Pipetten 12.
Platinnadeln 10, 33.
Platten-Kulturen 46.
Porzellan-Filter 9.
Pyrogallol 65.
Ragit-Nährböden 16, 20, 24.
Reagenzgläser 12, 147.
Reduktase-Probe 75.
Reinkultur 32, 62, 69.
Reisbrei 103.
Riesenkolonie 47, 147.
Säurefeste Bakterien 94.
Säure-Lab-Bakterien 85, 101.
Säurewecker-Prüfung 95.
Salpeter-Assimilation 117.
— -Bakterien 114.
— -Bouillon 114 f.
Samen-Sterilisierung 132.
Sarcina alba 138.
— aurantiaca 138.
— fulva 138.
— lutea 138.

Digitized by Google

Sarcina pulmonum 138.
— rosea 138.
— ureae 138.
Schimmelpilze 96, 102, 112 f. 116 f., 122.
Schleimbildung 88.
Schnittpräparate des Käses 97.
Schüttelkultur 50.
Schwefelwasserstoff 49, 136.
Sicherheitsbrenner 7.
Silbernitrat 27.
Soyka-Fläschchen 46 f.
Sporen 52—57.
Sproßpilze 91, 96, 102.
Stärke-Agar 116.
Stalluft, Keimgehalt 26, 80, 93.
Stallmist-Extrakt-Nährböden 104.
Sterilisier-Apparate 5—7.
Sterilisieren der Hände 66.
— der Nährböden 21—24.
— der Samen 132.
— diskontinuierliches 21.
Stichkultur 48.
Stickstoff-Bindung 132—134.
Streptococcus coli brevis 139.
— gracilis 139.
— hollandicus 139.
— Kefir 139.
— lactis 84, 139.
— — innocuus 139.
Streptococcus mastitidis 139.
— pyogenes 139.
Streptokokken 74, 84, 99.
Strichkulturen 47.
Stroh, Denitrifikation 115.
Succinate, Vergärung 101.
Symbiose 67.

Thermophile Mikroorganismen 110.
Thermostat 7.
Tisch-Beize 149.
Torfextrakt-Gelatine 135.
Traubenzucker 20, 48, 50, 134.
Trockenschrank 5.
Trommsdorffsche Probe 73.
Tropfen, hängender 42—44.
Tusche-Ausstrichpräparate 41 f.
Tuschepunkt-Kultur 69.
Tyrothrix 101.

Verdünnungsverfahren 31, 68.

Wasser, Keimgehalt 30—32, 81.
Wasserstoff-Bildung 109 f.
— -Oxydation 123.
Wasserstoff-Superoxyd 76, 91.
Watte 12, 20.
Würze-Agar 103, 108.

Zählen der Bakterien 27 f., 105.
Zellulose-Zersetzung 108, 122.
Zucker, Gasbildung 50, 109, 121.

Digitized by Google

Verlag von Gebrüder Borntraeger in Berlin
W 35 Schöneberger Ufer 12a

Bibliothek für naturwissenschaftliche Praxis,

herausgegeben von **Dr. W. Wächter.**

Bd. I: **Praxis der Linsenoptik** in einfachen Versuchen zur Erläuterung und Prüfung optischer Instrumente von **Dr. Wilhelm Volkmann.** Mit 36 Textabbildungen u. 4 Tafeln. Taschenbuchformat. Geb. 3 Mk. 50 Pfg.

Bd. II: **Anleitung zum praktischen Studium niederer Tiere** von **Dr. W. Schleip.** Mit 56 Textabbildungen. Taschenbuchformat. Gebunden 3 Mk. 50 Pfg.

Bd. III: **Die praktische Bodenuntersuchung** von **Prof. E. Heine.** Mit 25 Textabbildungen und einer geologisch-agronomischen Karte. Taschenbuchformat. Gebunden ca. 4 Mk.

Unter der Presse:

Bd. IV: **Praktikum der experimentellen Mineralogie und Kristallographie** von **Prof. Dr. Sommerfeldt.**

Ausführliche Prospekte gratis und franko

Digitized by Google

Verlag von Gebrüder Borntraeger in Berlin
W 35 Schöneberger Ufer 12a

Botanisches mikroskopisches Praktikum

für Anfänger von **Prof. Dr. H. Möbius.** Zweite veränderte Auflage. Mit 15 Abbildungen. Gebunden 3 Mk. 20 Pfg.

Die Bedeutung der Reinkultur.

Eine Literaturstudie von **Dr. Oswald Richter,** Privatdozenten und Assistenten am Pflanzenphysiologischen Institut der deutschen Universität in Prag. Mit drei Textfiguren. Geheftet 4 Mk. 40 Pfg.

Die Beschädigung der Vegetation durch Rauch

Handbuch zur Erkennung und Beurteilung von Rauchschäden von **Dr. E. Haselhoff,** Vorsteher der landwirtschaftlichen Versuchsstation in Marburg i. H., und **Prof. Dr. G. Lindau,** Privatdozent der Botanik und Kustos am Kgl. Botan. Garten in Berlin. Mit 27 Textabbildungen. Großoktav. Broschiert 10 Mk., gebunden 11 Mk.

Das Problem der Befruchtungsvorgänge

und andere cytologische Fragen von **Prof. Dr. B. Němec,** Vorstand des pflanzenphysiologischen Institutes der k. k. böhmischen Universität Prag. Mit 119 Abbildungen im Text und 5 lithographischen Doppeltafeln. Geheftet 20 Mk., gebunden 23 Mk. 50 Pfg.

Studien über die Regeneration

von **Prof. Dr. B. Němec.** Mit 180 Textabbildungen. Geheftet 9 Mk. 50 Pfg., gebunden 11 Mk. 50 Pfg.

Ausführliche Prospekte gratis und franko

Digitized by Google

Verlag von Gebrüder Borntraeger in Berlin
W 35 Schöneberger Ufer 12a

Einführung in die Mykologie der Nahrungsmittelgewerbe von **Professor Dr. Alexander Kossowicz**, Privatdozent an der Technischen Hochschule in Wien. Mit 21 Abbildungen im Text und auf Tafeln. Gebunden ca. 5 Mk.

Dieser Leitfaden enthält in gedrängter übersichtlicher Darstellung die Methoden der mykologischen Untersuchung der Nahrungsmittel unter Hinweis auf die wichtigsten als Nahrungsmittelzersetzer in Betracht kommenden Pilzgruppen. Behandelt werden die Bakteriologie des Molkereiwesens (Butter, Milch, Käse), die Zersetzung und Haltbarmachung von Fleisch, Obst, Gemüse, die Mykologie der Bäckerei, der Zuckerfabrikation und der Tierfuttermittel unter besonderer Berücksichtigung der neuesten einschlägigen Literatur.

In Vorbereitung befindet sich:

Einführung in die Mykologie der Genussmittel und in die Gärungsphysiologie von **Professor Dr. A. Kossowicz.** Mit vielen Textabbildungen und zwei Tafeln. Geheftet ca. 5 Mk.

Inhalt: Mykologie der Brauerei, der Brennerei, der Rumfabrikation, Preßhefefabrikation, der Weinbereitung, Champagnerfabrikation, der Essigfabrikation, Senffabrikation, der Kaffee-, Tee-, Kakaogärung und der Tabakfermentation.

Ausführliche Prospekte gratis und franko

Digitized by Google

Verlag von Gebrüder Borntraeger in Berlin
W 35 Schöneberger Ufer 12a

Handbuch

der

landwirtschaftlichen Bakteriologie

von

Dr. F. Löhnis

Privatdozent an der Universität Leipzig

XII, 907 Seiten. Grossoktav. Geheftet 36 Mk.

**** * Solid in Halbfranz gebunden 41 Mk. * ****

Wenn man so überblickt, was in den 907 Seiten des Werkes in mühsamer, gewiß jahrelanger Arbeit zusammengetragen, kritisch gesichtet und geordnet wurde, so erkennt man erst die Riesenarbeit, die hier geleistet wurde. Was bisher in unzähligen Werken zerstreut war und wozu man, um es zu finden, oft lange Zeit brauchte, ist hier wie auf einem Präsentierteller, vor einem ausgebreitet. Nicht vergessen dürfen die reichhaltigen und genauen Literaturangaben werden, welche das Suchen nach einer bestimmten Arbeit wesentlich erleichtern. Die Übersichtlichkeit ist in diesem großen Werke so gut, daß sich selbst ein Laie leicht zurecht finden könnte. Wenn auch der höhere, jedoch gewiß nicht zu hoch gegriffene Preis die Anschaffung dieses Werkes nicht jedermann ermöglicht, so ist doch zu wünschen, daß dies vorzügliche Handbuch die möglichst weitgehendste Verbreitung in landwirtschaftlichen Kreisen finden möge.

Ausführliche Prospekte gratis und franko

Digitized by Google

Digitized by Google

UNIVERSITY OF CALIFORNIA LIBRARY
BERKELEY

Return to desk from which borrowed.
This book is DUE on the last date stamped below.

Biology Library

LD 21–95m–11,'50(2877s16)476

Digitized by Google

Digitized by Google